

Université de Sherbrooke

Purification de séquences homologues à l'ADN complémentaire  
de la métallothionéine-I de souris à partir  
d'une banque génomique de lapin

par

François Denis

Département de microbiologie

Thèse présentée à la Faculté de  
médecine en vue de l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Mars 1987

## SOMMAIRE

Les hybridations d'ADN génomique de lapin avec l'ADNc de métallothionéine-I de souris ont révélé que les MTs de lapin étaient représentées par une famille de gènes. Afin d'obtenir une sonde de MT de lapin, pour isoler l'ensemble des gènes MT, une banque génomique a été construite dans le phage  $\lambda$ gt-10. Quatre clones ont été isolés avec la sonde MT-I de souris. Deux de ces clones ont été sous-clonés dans le plasmide pUC13 et caractérisés par carte de restriction. Par hybridation, les régions homologues à la MT-I de souris et les régions d'ADN répétitif ont été localisées sur les clones. Un clone est plus homologue à la MT-II qu'à la MT-I de souris alors que l'autre est aussi homologue à la MT-I qu'à la MT-II de souris. Des sous-clones dont l'ADN répétitif a été enlevé ont été construits permettant d'avoir des sondes spécifiques de MT de lapin.

## REMERCIEMENTS

Je remercie les Drs Pierre et Danielle Bourgaux, le Dr Marcel Bastin, le Dr Pierre Chartrand, le Dr Joseph Weber et le Dr David Gibson pour l'aide et la formation qu'ils m'ont apportées.

Je tiens particulièrement à remercier mes amis et collègues de travail Jacques Thibodeau, Stephen Blakeley, Jacques Haket, Manuel Hassan, Richard Brzezinski, Maria Smorawska, Normand Robert, Normand Laframboise, Nezha Alami, Guy Vézina, Dominique Blais, Jean-Charles Côté, Majambu M'Bikay, Brian Talbot, et Claude Déry.

Je dédie ce mémoire à Lucie, mon épouse.

## TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE .....	i
REMERCIEMENTS .....	ii
TABLE DES MATIERES .....	iii
LISTE DES FIGURES .....	v
LISTE DES ABBREVIATIONS .....	vii
INTRODUCTION .....	1
MATERIEL ET METHODES .....	9
I. Souches bactériennes et bactériophage utilisés .....	9
II. Buvarpage d'ADN génomique de lapin .....	9
A) Purification de l'ADN de lapin .....	9
B) Gels d'agarose verticaux .....	10
C) Transfert d'ADN sur nitrocellulose .....	10
D) Préparation des sondes radioactives .....	10
E) Hybridation et autoradiographie .....	11
III. Construction d'une banque génomique de lapin .....	12
A) Purification de l'ADN de $\lambda$ gt-10 .....	12
B) Ligation de l'ADN de lapin au vecteur $\lambda$ gt-10 .....	13
C) Préparation des extraits d'encapsidation <u>in vitro</u> ...	13
D) Encapsidation de la banque et amplification .....	14
IV. Criblage de la banque et purification des clones .....	14
A) Criblage de la banque de lapin .....	14
B) Analyse des clones par buvarpage .....	15
V. Sous-clonage des clones purifiés dans le plasmide pUC13 .	15
A) Préparation d'ADN plasmidique .....	15



B) Ligation de l'ADN des clones au vecteur .....	16
C) Transformation de <u>E. coli</u> JM109 .....	16
D) Criblage par hybridation sur colonies .....	16
E) Construction d'une carte de restriction des sous-clones .....	17
F) Génération de sous-clones de délétion .....	17
RESULTATS .....	19
DISCUSSION .....	48
CONCLUSION .....	54
BIBLIOGRAPHIE .....	55

## LISTE DES FIGURES

Fig. 1:	Comparaison des séquences nucléotidiques des MTs connues .	3
Fig. 2:	Buvarpages de l'ADN génomique de lapin .....	20
Fig. 3:	Criblage de la banque génomique de lapin .....	23
Fig. 4:	Buvarpage sur les candidats du premier criblage .....	25
Fig. 5:	Carte de restriction de $\lambda$ gt-10 .....	27
Fig. 6:	Séparation électrophorétique et buvarpage des fragments de restriction (EcoRI et XhoI) des clones purifiés .....	28
Fig. 7:	Séparation électrophorétique et buvarpage des fragments de restriction (HindIII et BglII) des clones purifiés ....	31
Fig. 8:	Séparation électrophorétique et buvarpage des fragments de restriction (SmaI et BamHI) des clones purifiés .....	34
Fig. 9:	Criblage par hybridation sur colonies .....	37
Fig. 10:	Séparation électrophorétique des fragments de restriction de pRMT-44 .....	38

Fig. 11: Séparation électrophorétique des fragments de restriction de pRMT-48 .....	40
Fig. 12: Carte de restriction des insertions de pRMT-44 et de pRMT-48 .....	42
Fig. 13: Stratégie de génération des sous-clones de délétion .....	43
Fig. 14: Séparation électrophorétique de fragments de restriction des sous-clones de délétion .....	45
Fig. 15: Carte de restriction de pRMT14.5 .....	47

LISTE DES ABBREVIATIONS

A:	Adénine
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
ATP:	Adénosine 5'-Triphosphate
C:	Cytosine
cpm:	Coups par minute
CTP:	Cytosine 5'-Triphosphate
d:	Désoxy
DNase:	Désoxyribonucléase
DO <sup>600</sup> :	Densité optique à 600 nm
<u>E. coli:</u>	<u>Escherichia coli</u>
G:	Guanine
GTP:	Guanosine 5'-Triphosphate
hr(s):	heures(s)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
Kb:	Kilobase
LTR:	Long Terminal Repeat
MMTV:	Mouse Mammary Tumor Virus
MT:	Métallothionéine
pfu:	Unité plaque-formante
PEG:	Polyéthylène glycol
Pu:	Purine

Py:	Pyrimidine
RNase:	Ribonucléase
rpm:	Révolutions par minute
T:	Thymine
TTP:	Thymidine 5'-Triphosphate
U:	Unité
uCi:	Microcurie
ul:	Microlitre
ug:	Microgramme
V:	Volt
X-gal	5-bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

## INTRODUCTION

Les métallothionéines sont des protéines ubiquistes dans le règne animal, de 61 acides aminés chez les vertébrés, ne possédant pas d'acides aminés aromatiques, ni de leucine; elles se caractérisent par le fait qu'elles peuvent lier de 5 à 7 atomes-grammes des cations Zn, Cu, Cd et Hg par mole de protéines, en vertu de leur contenu élevé en cystéine (30%) (Kagi et Norberg, 1979). La protéine est divisée en deux domaines: le domaine A qui peut lier 4 cations et le domaine B qui peut en lier 3 (Boulanger et al., 1983). La complexation se fait d'abord dans le domaine A, puis coopérativement dans le domaine B; la dissociation se fait dans l'ordre inverse. L'affinité du domaine A pour les cations est  $Cu > Zn > Cd$  et celle du domaine B est  $Cd > Zn > Cu$  (Neilson et Winge, 1983). Les MTs sont des protéines intra-cellulaires puisqu'elles ne possèdent pas de peptide signal et leurs ARNm correspondants sont associés aux polyribosomes libres (Shapiro et Cousins, 1980).

Les MTs sont hautement conservées tant au niveau de leur séquence protéique que de leur séquence nucléotidique (Fig. 1) et la position des cystéines est conservée. Le gène est divisé en 3 exons et la position des 2 introns est invariable; le premier intron mesure de 251 à 585 pb et le second, de 143 à 406 pb chez les différentes espèces. Chez les vertébrés, on retrouve deux isométallothionéines majeures, la MT-I et la MT-II. La souris n'a qu'un seul gène correspondant à la MT-I et à la MT-II, situés à 6 Kb d'intervalle (Searle et al., 1984) sur le chromosome 8 (Cox et Palmiter, 1983). Chez les primates il y a une

micro-hétérogénéité au niveau de la MT-I (Koizumi et al., 1985), et Kagi et al. (1984) ont démontré l'existence de 4 ou 5 MT-I chez l'humain. Le clonage des gènes MT humains a révélé la présence d'un seul gène MT-II fonctionnel (Karin et Richards, 1982) et plusieurs gènes MT-I fonctionnels (Richards et al., 1984; Varschney et al., 1986) tous situés sur le chromosome 16 (Karin et al., 1984c). De plus, chez le rat et l'humain, il existe plusieurs rétropseudogènes de MT, intégrés dans des chromosomes différents de celui d'origine (Andersen et al., 1986; Varshney et Gedamu, 1982; Karin et Richards, 1982). Chez le lapin, il existe une microhétérogénéité des MTs, indiquant qu'elles sont représentées par une famille de gènes (Otvos et Armitage, 1980; Boulanger et al., 1983).

Les MTs sont exprimées dans tous les tissus à l'exception du thymus (Durnam et Palmiter, 1981), mais leurs sites de synthèse majeure sont le foie, les reins et l'intestin (Karin et Herschman, 1981; Brady et Webb, 1981). La synthèse des métallothionéines est inductible par les métaux lourds (Durnam et Palmiter, 1981; Karin et al., 1980), les hormones glucocorticoïdes (Hager et Palmiter, 1981; Karin et Herschman, 1981), l'interleukine-I (Disilvestro et Cousins, 1984) et l'interféron- $\alpha$  (Freidman et Stark, 1985), et cette inductibilité est indépendante du cycle cellulaire (Tobey et Seagrave, 1984).

Le gène MT-I de souris transfecté dans des cellules de souris et humaines conserve sa régulation par les métaux lourds. Les séquences nécessaires à l'induction par les métaux lourds ont été localisées à 90 pb du début de la transcription par des délétions progressives in

**Figure 1. COMPARAISON DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES MTs CONNUES.**

Compilation personnelle des séquences couvrant la région homologue à la sonde utilisée (fragment *Ava*II de 220 pb de l'ADNc de MT-I de souris). La sonde MT-II de souris utilisée commence au site *Rsa*I indiqué; tiré de Karin et Richards (1982), Schmidt et Hamer (1983), Griffith et al. (1983), Peterson et al. (1984), Richards et al. (1984), Searle et al. (1984), Varshney et Gedamu (1984), Varshney et al. (1986), Andersen et al. (1986). So: souris, R: rat, HC: hamster chinois, M: mouton, Si: singe, H: humain,  $\Psi$ :pseudogène  $\Delta$ :délétion. La position des introns est indiquée par une ligne verticale. Les séquences identiques à la séquence consensus sont représentées par un point (.), les mutations silencieuses sont en minuscules et les mutations qui changent l'acide aminé de la séquence consensus sont en majuscules. La séquence protéique consensus est indiquée; Met: méthionine, Asp: acide aspartique, Pro: proline, Asn: asparagine, Cys: cystéine, Ser: sérine, Ala: alanine, Thr: thréonine, Val: valine, Gly: glycine, Lys: lysine, Glu: acide glutamique, Gln: glutamine.



So	MT-I	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
----	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Figure 1

vitro (Mayo et al., 1982; Brinster et al., 1982). Une séquence de 12 pb que l'on retrouve 5 fois dans le promoteur de la MT-I de souris, a été synthétisée et insérée devant le gène de la thymidine kinase, lui conférant une régulation par les métaux lourds (Stuart et al., 1984). Au moins 4 des 5 séquences sont actives, la combinaison de plusieurs séquences donne une meilleure régulation indiquant qu'il y a coopérativité ou synergie entre elles (Stuart et al., 1985).

Les agents alkylants, tel que l'iodoacétate, induisent la synthèse des MTs bien que leur cible primaire soit le glutathion (Cagen et Klaassen, 1980; Tobey et al., 1982). Les agents alkylants et les métaux Ag, Ni et Co sont des inducteurs gratuits c'est-à-dire qu'ils induisent la synthèse des MTs bien qu'ils aient peu d'affinité pour elles; ceci milite contre une auto-régulation de l'expression des MTs. Les inducteurs gratuits ainsi que les inducteurs classiques (Zn, Cu, Cd, Hg) ont tous une affinité pour les thiolates indiquant que la molécule régulatrice possède des groupements thiolates sensibles (Durnam et Palmiter, 1984). Séguin et al. (1984) ont démontré par des expériences de compétition que la régulation des métallothionéines par les métaux lourds est positive. Des lignées de thymocytes peuvent être amenées à exprimer les MTs et à acquérir une résistance aux métaux lourds, par traitement avec des agents qui provoquent une déméthylation de l'ADN, soit les rayons ultra-violets (Lieberman et al., 1983) ou la 5-azacytidine (Compere et Palmiter, 1981); l'ADN en 5' des gènes MTs devient progressivement déméthylé par rapport à la lignée parentale. Ceci est en accord avec la corrélation inverse entre la méthylation de l'ADN et l'expression des gènes (Doerfler, 1983).

Les hormones glucocorticoïdes produites lors d'un stress sont des inducteurs de la transcription des MTs (Karin et al., 1980; Hager et Palmiter, 1981). Chez l'humain, seul le gène MT-II est induit par les glucocorticoïdes, et Karin et al. (1984b) ont localisé à 237 pb - 268 pb du début de la transcription une séquence qui lie le récepteur des glucocorticoïdes et est homologue aux séquences retrouvées dans les LTRs de MMTV et dans le promoteur du gène de lysozyme de poulet. Chez la souris, il a été impossible de localiser de telles séquences, puisque la régulation par les glucocorticoïdes est perdue lors de la transfection (Brinster et al., 1982; Mayo et al., 1982; Pavlakis et Hamer, 1983) ou de l'amplification (Mayo et Palmiter, 1982). Chez la souris les gènes MT-I et MT-II sont régulés de manière coordonnée par les glucocorticoïdes et les métaux lourds (Yagle et Palmiter, 1985).

Lors d'une infection bactérienne, il y a redistribution du zinc plasmatique vers le foie et l'accumulation est due à une synthèse de novo des MTs hépatiques (Sobocinski et al., 1978). Un composant des parois bactériennes, un lipopolysaccharide, stimule les macrophages à produire, l'Interleukine-I (IL-I) qui provoque l'induction hépatique des protéines de la phase aiguë (acute-phase) (Durum et al., 1985). L'IL-I induit la synthèse hépatique et rénale des MTs (Sobocinski et Canterbury, 1982) indépendamment des glucocorticoïdes (Disilvestro et Cousins, 1984). La région d'ADN nécessaire à l'induction par le lipopolysaccharide a été localisée à 185-305 pb du début de la transcription; cette induction est indépendante des métaux lourds et des hormones glucocorticoïdes (Durnam et al., 1984).

Les interférons sont des lymphokines produites lors d'une infection virale et préparent l'organisme à la défense anti-virale (Lengyel, 1982). Freidman et al. (1984) ont vu que la MT-II est induite dans une lignée de cellules humaines par l'interféron- $\alpha$ ; les séquences en 5' d'antigènes d'histocompatibilité induits et celles de la MT-II montrent une séquence homologue d'environ 30 pb (Freidman et Stark, 1985).

La première fonction proposée pour les MTs fut la détoxification des métaux lourds, notamment le Cd (Kagi et Nordberg, 1979). Une injection de Zn à des animaux induit la synthèse des MTs et les protège contre une dose toxique de Cd (Webb, 1972). Des lignées de cellules en culture sélectionnées pour leur résistance au Cd ont des gènes MTs amplifiés et ont un degré de résistance au Cd proportionnel au taux d'expression des MTs (Beach et Palmiter, 1981; Gick et McCarty, 1982; Stallings et al., 1984; Crawford et al., 1985).

Puisque le Cd n'est pas rencontré fréquemment dans le milieu, la pression sélective n'est pas assez forte pour justifier l'évolution des MTs; il est plus probable que la fonction primaire des MTs soit l'homéostasie du Zn et du Cu (Karin, 1985). La synthèse des MTs suit l'apport diététique de Zn et de Cu, créant ainsi un réservoir de ces métaux (Cousins, 1985). Les MTs sont capables de réactiver des apoenzymes aussi efficacement que les ions libres (Li et al., 1980; Udom et Brady, 1980). Les MTs servent donc de donneurs et de réservoir de Cu et de Zn tout en protégeant la cellule contre les effets toxiques des cations libres (Cousins, 1985).

L'induction des MTs par les glucocorticoïdes provoque une redistribution du Zn et du Cu plasmatique vers les reins et le foie pour fournir ces co-facteurs nécessaires aux enzymes pour faire face au stress (Brady, 1982). Les MTs sont aussi impliquées dans le transfert des métaux de la mère vers le fœtus afin de fournir le Zn et le Cu aux enzymes nécessaires au développement (Andersen et al., 1983).

Le fait que les interférons et l'interleukine-I induisent les MTs suggère qu'elles ont un rôle à jouer dans la défense immunitaire. Les macrophages libèrent de l'oxygène actif pour détruire les organismes étrangers (Beaman et Beaman, 1984). Parmi les protéines de la phase aiguë induites par l'interleukine-I, on retrouve la céruloplasmine (protéine plasmatique à Cu qui détruit le radical superoxyde) et les MTs (protéine intracellulaire à Zn qui détruit le radical hydroxyl) (Cousins, 1985). Il semble que l'induction coordonnée de ces anti-oxydants par l'interleukine-I sert à protéger les tissus de l'hôte des produits toxiques des macrophages (Karin, 1985).

Puisque les métallothionéines sont inductibles par les métaux lourds, les hormones glucocorticoïdes, l'interleukine-I, et l'interféron- $\alpha$  ceci en fait un modèle de choix pour l'étude de la régulation de l'expression génétique chez les eucaryotes. Le clonage des gènes MT chez la souris, le rat et l'humain a permis de mettre en évidence des séquences régulatrices conservées et l'existence d'une famille de gènes étendue chez le rat et l'humain. Les lapins appartiennent à la classe des lagomorphes, chez lesquels on retrouve une micro-hétérogénéité au niveau des MTs, comme chez l'humain indiquant que

les MTs de lapin sont représentées par une famille de gènes. La purification d'un gène de lapin permettrait d'avoir une sonde spécifique afin d'isoler l'ensemble des gènes MT fonctionnels qui sont probablement liés comme chez l'humain. L'objet de ce mémoire consiste en la purification de gènes de métallothionéine de lapin à partir d'une banque génomique construite dans le bactériophage  $\lambda$ gt-10 à l'aide d'une sonde d'ADNc de MT-I de souris.

## MATERIEL ET METHODES

### I. SOUCHES BACTERIENNES ET BACTERIOPHAGE UTILISES

E. coli K-12 La 101 (F<sup>-</sup>, lac Y, leu, ton A, thi-1, sup E, sup F, rk<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>)

E. coli K-12 C600 Hfl (F<sup>-</sup>, lac Y1, leu B6, ton A21, thi-1, thr-1, Hfl, λ<sup>-</sup>)

E. coli K-12 131 (rec A (λimm 434, cIts, b2, red 3, Eam 4, Sam 7)/λ)

E. coli K-12 154 (rec A (λimm 434, cI857, b2, red 3, Aam 11, Sam 7)/λ)

E. coli K-12 JM109 (rec A21, Δlac-pro, end A1, gyr A96, thi-1, rel A1, sup E44, hsdR17, F' (TraD36, pro AB<sup>+</sup>, lac I<sup>q</sup>-zΔM15))

Bactériophage λgt-10λ srIλ1<sup>0</sup>, b527, srIλ3<sup>0</sup>, imm 434 (srI434<sup>+</sup>), srIλ4<sup>0</sup>, srIλ5<sup>0</sup>.

### II. BUWARDAGE DE L'ADN DE LAPIN

#### II-A. PURIFICATION DE L'ADN DE LAPIN

Un lapin de Nouvelle-Zélande est sacrifié et un homogénat de foie 10% dans du tampon de lyse (McKnight, 1978) est préparé, puis incubé 2 hrs à 60°C. On centrifuge 15 minutes à 4 Krpm, à 4°C et le surnageant est extrait 3 fois avec 1 volume de phénol: chloroforme (1:1) et 2 fois avec 1 volume

de chloroforme. La phase aqueuse est amenée à 0.15 M NaCl puis l'ADN est précipité avec un volume d'isopropanol et resuspendu dans du tampon TE. L'ARN est digéré 30 minutes à 65°C avec 50 ug/ml de RNase A traitée (Maniatis et al., 1982). L'ADN est phénolisé, précipité à l'éthanol et resuspendu dans de l'eau.

#### II-B. GELS D'AGAROSE VERTICAUX

L'ADN digéré est fractionné sur gel vertical d'agarose 1% de 14.5 cm X 13.5 cm X 0.3 cm dans du tampon TAE (Maniatis et al., 1982). On applique 10 ug d'ADN génomique par puit de 1 cm et l'électrophorèse s'effectue à 2 V/cm pendant environ 16 hrs. Le gel est coloré au bromure d'éthidium (50 ug/ml), puis photographié sur film SA 3000 (Polaroid) avec un filtre rouge.

#### II-C. TRANSFERT D'ADN SUR NITROCELLULOSE

Les buvardages d'ADN sont faits tel que décrit par Meinkoth et Wahl, (1984) sauf que l'ADN est dépuriné 5 minutes pour les buvardages génomiques et n'est pas dépuriné pour les buvardages des clones purifiés. Le transfert s'effectue pendant 2 hrs puis le filtre est cuit 1 hr à 80°C.

#### II-D. PREPARATION DES SONDES RADIOACTIVES

Les sondes par déplacement d'encoche sont préparées sur 100 ng de plasmide avec 65 uCi de dATP<sup>32</sup> et 65 uCi de dCTP<sup>32</sup> (Maniatis et al., 1982). La sonde est séparée de la



radio-activité libre sur une colonne de Sephadex G-75 de 1 ml. Le premier pic de radio-activité est récolté et l'activité spécifique est mesurée par effet Cerenkov.

Les sondes à la polymérase du phage T4 sont préparées sur 400 ng de plasmide linéarisé par EcoRI avec 100 uCi de dATP<sup>32</sup> et 100 uCi de dCTP<sup>32</sup> (O'Farrell, 1981). La réaction d'exonucléase s'effectue pendant 5 minutes. L'insertion est excisée par digestion d'une heure avec PstI, puis la sonde est séparée des nucléotides radio-actifs non-incorporés sur Sephadex G-75. La sonde est précipitée à l'éthanol puis resuspendue dans 50 ul d'eau. On applique sur un gel horizontal d'agarose 2% (Sigma type IX, P.F. = 45°C) et l'électrophorèse s'effectue à 6 V/cm pendant 2 à 3 hrs. L'insertion est localisée par autoradiographie de 5 minutes, le gel est découpé puis fondu à 65°C. Un aliquot est compté par effet Cerenkov pour évaluer l'activité spécifique.

Les sondes sont dénaturées à 100°C pendant 15 minutes puis placées dans la glace. La sonde est ajoutée à de la solution de pré-hybridation à raison de 10<sup>6</sup> cpm/ml pour une sonde à la T4 et 10<sup>7</sup> cpm/ml pour une sonde par déplacement d'encoche.

## II-E. HYBRIDATION ET AUTORADIOGRAPHIE

Le filtre de nitro-cellulose est scellé dans un sac de plastique dans lequel on introduit 25 ml de solution de pré-hybridation (Maniatis et al., 1982). On incube à 37°C, de

16 à 60 hrs, puis la solution de pré-hybridation est remplacée par 10 ml de solution fraîche contenant la sonde radio-active ( $10^6$  à  $10^7$  cpm/ml), et on incube de 16 à 60 hrs à 37°C.

Les filtres sont lavés 30 min. à 25°C avec 500 ml de SSC 4X, SDS 0.1%. Les filtres sont séchés et exposés à -70°C avec un écran Lightning plus (Dupont) et un film XAR-5 (Kodak).

### III. CONSTRUCTION D'UNE BANQUE GENOMIQUE DE LAPIN

#### III-A. PURIFICATION DE L'ADN DE $\lambda$ gt-10

Environ  $4 \times 10^7$  bactéries La 101 et  $2 \times 10^6$  pfu de  $\lambda$ gt-10 sont étalés sur un pétri de 15 cm et on incube de 7 à 8 hrs à 37°C. Les phages sont récupérés par diffusion dans 5 ml de SM et sont pré-adsorbés 20 minutes avec  $2 \times 10^7$  bactéries La 101, puis incubés 16 hrs à 37°C dans 1 l de LB-Mg. La culture est centrifugée 15 min. à 4 Krpm à 4°C puis le surnageant est incubé 1 hr à 37°C avec 10 ug/ml de DNase I et 10 ug/ml de RNase A (Huynh et al., 1984). Les phages sont précipités en présence de NaCl 1 M et PEG 8000 10% pendant 16 hrs à 4°C, puis centrifugés 30 min. à 6 Krpm à 4°C. Les culots sont resuspendus dans 8 ml de tampon SM et déposés sur 3 coussins de chlorure de césium de densités de 1.35 g/ml, 1.53 g/ml et 1.65 g/ml. On centrifuge à 35 Krpm pendant 2.5 hrs à 20°C. Les phages situés dans la couche intermédiaire de chlorure de

césium, sont gardés à 4°C (Maniatis et al., 1982). La suspension de phages est dialysée (Maniatis et al., 1982) deux fois contre 2 l de tampon TE puis l'ADN est phénolisé, précipité à l'éthanol, puis resuspendu dans de l'eau.

### III-B. LIGATION DE L'ADN DE LAPIN AU VECTEUR

Les extrémités COS du vecteur (25 ug) sont ligaturées pendant 16 hrs à 16°C dans 50 ul de tampon de ligation contenant 10 U de ligase de T4 et 15% de PEG 8000 (Pheiffer et Zimmerman, 1983). L'ADN est phénolisé, précipité à l'éthanol et resuspendu dans 25 ul d'eau. Le vecteur est digéré avec EcoRI, puis la ligation est effectuée comme pour les extrémités COS, en présence d'ADN de lapin coupé par EcoRI; les rapports molaires vecteur: insertion testés ont été de 5:1, 2:1, 1:1, et 1:5.

### III-C. PREPARATION DES EXTRAITS D'INCAPSIDATION IN VITRO

Les extraits d'encapsidation in vitro sont préparés tel que décrit par Scherer et al. (1981). La souche 131 donne lysat FTL (Freeze-Thaw Lysate) et la souche 154 donne le lysat SE (Sonicated Extract). Les extraits sont gardés dans de l'azote liquide en aliquots de 100 ul pour le lysat FTL et de 50 ul pour le lysat SE.

Puisque l'activité de chaque lysat varie, il faut optimiser le rapport SE: FTL. A 500 ug d'ADN ligaturé de  $\lambda$ gt-10, on ajoute 7 ul de tampon A, 2 ul de tampon M1, 6 ul de SE et de

20 à 45 ul de FTL. On agite 1 hr à 25°C sur un Lab-Quake (LABindustries) puis on ajoute 1 ml de tampon SM à chaque mélange d'encapsidation et on titre sur la souche La 101.

#### III-D. ENCAPSIDATION DE LA BANQUE ET AMPLIFICATION

200 ng de vecteur ligaturé à de l'ADN de lapin sont encapsidés; on utilise 20 ul de lysat FTL. Dix réactions d'encapsidation simultanées sont faites et on les rassemble et titre sur les souches La 101 et C600 Hfl.  $5 \times 10^5$  pfu sont gardés pour le criblage et  $5 \times 10^5$  pfu sont amplifiés sur 10 boîtes de 15 cm de LB-Mg. Par boîte, on étale  $10^8$  bactéries C600 Hfl et  $5 \times 10^4$  pfu de la banque et on incube 16 hrs à 37°C. Les phages sont récupérés par diffusion dans 10 ml de SM, puis la suspension de phages est précipitée au PEG et concentrée sur gradient de chlorure de césium dont la couche de densité 1.53 g/ml a été omise. La banque est titrée sur la souche C600 Hfl et conservée à 4°C.

#### IV. CRIBLAGE DE LA BANQUE ET PURIFICATION DES CLONES

##### IV-A. CRIBLAGE DE LA BANQUE

Pour le premier criblage on étale  $4 \times 10^4$  phages par boîte de 15 cm, pour les criblages subséquents on étale 2000, 500 et 50 phages par boîte de 7.5 cm avec  $2 \times 10^7$  bactéries C600 Hfl. On incube 16 hrs à 37°C, 1 hr à 4°C, puis 2 filtres de nitrocellulose sont déposés 2 et 5 minutes respectivement sur les boîtes. Les filtres sont traités tel que décrit par

Benton et Davis (1977), cuits 1 hr à 80°C puis pré-hybridés, hybridés et lavés. Les clones positifs sont repiqués et gardés à 4°C dans 500 ul de tampon SM contenant une goutte de chloroforme.

#### IV-B. ANALYSE DES CLONES PAR BUVARDAGE

De l'ADN des clones purifiés est préparé en milieu liquide, digéré par EcoRI, HindIII, BamHI, BglII, SmaI et XhoI et fractionné sur gel vertical d'agarose 1.3% dans le tampon TEA. L'ADN est buvardé et hybridé avec l'ADNc de la MT-I de souris, l'ADNc de la MT-II de souris et l'ADN total de lapin afin de détecter les séquences répétitives.

#### V. SOUS-CLONAGE DES CLONES PURIFIÉS DANS LE PLASMIDE pUC13

##### V-A. PURIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE

De l'ADN plasmidique est préparé à grande échelle de la manière suivante: 1 l de 2YT avec Ampicilline (50 ug/ml) est inoculé avec 5 ml d'une culture ( $D.O._{600} = 2.0$ ) de bactéries et on incube 16 hrs à 37°C. L'ADN plasmidique est isolé par la lyse au triton X-100 suivi d'une centrifugation sur gradient de chlorure de césium auto-formé (Maniatis et al., 1982). La bande de plasmide est prélevée et le bromure d'éthidium est extrait avec de l'isopropanol saturé en chlorure de césium. La solution est dialysée, phénolisée, précipitée à l'éthanol et l'ADN est resuspendu dans de l'eau.

L'ADN plasmidique est préparé à petite échelle de la manière suivante: une colonie unique est inoculée dans 5 ml de 2YT avec Ampicilline (50 ug/ml) et on incube 16 hrs à 37°C. L'ADN plasmidique est isolé par la lyse alcaline (Maniatis et al., 1982) puis est resuspendu dans 25 ul d'eau.

#### V-B. LIGATION DE L'ADN DES CLONES AU VECTEUR pUC13

L'ADN (5 ug) de clone purifié et 500 ng de pUC13 coupés par EcoRI sont co-précipités à l'éthanol puis resuspendus dans 30 ul de tampon de ligation contenant 5 U de ligase de T4 et incubés 16 hrs à 16°C.

#### V-C. TRANSFORMATION DE E. coli JM109

Des bactéries JM109 compétentes sont préparées tel que décrit par Yanisch-Perron et al. (1985). Les bactéries compétentes sont transformées tel que décrit par Maniatis et al. (1982) avec 50 à 100 ng d'ADN. On étale 10, 25, 100, et 200 ul du mélange de transformation sur pétris de 2YT supplémentés d'Ampicilline 50 ug/ml, de X-gal 4 mg/ml et d'IPTG 0.1 mM puis on incube 16 hrs à 37°C.

#### V-D. CRIBLAGE PAR HYBRIDATION SUR COLONIES

Un filtre de nitro-cellulose stérile est déposé 10 minutes sur le pétri (50-250 colonies par pétri), puis le filtre est pelé de manière à ce que les colonies adhèrent au filtre. Le pétri est incubé 16 hrs à 37°C afin que les colonies repoussent. Le filtre est traité selon Grunstein et Wallis

(1976), puis est cuit 1 hr à 80°C, lavé 16 hrs avec agitation dans du SSC 4X à 25°C, pré-hybridé, hybridé et lavé.

#### V-E. CONSTRUCTION D'UNE CARTE DE RESTRICTION DES SOUS-CLONES

De l'ADN des sous-clones purifiés est préparé à grande échelle. Une carte de restriction est construite en digérant 1 ug d'ADN plasmidique avec les enzymes suivants: ApaI, AvaII, BamHI, BglI, BglII, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, PvuII, SacI, SmaI, StuI, et XhoI. Des doubles digestions sont effectuées par digestion avec un premier enzyme, précipitation à l'éthanol et digestion par un second enzyme. La taille des fragments générés est évaluée sur gel horizontal d'agarose 1.3% par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire (1 Kb ladder, BRL).

#### V-F. GENERATION DE SOUS-CLONES DE DELETION

Des délétions sont générées en digérant le clone avec un enzyme qui coupe dans le site de clonage multiple de pUC13 et dans l'insertion, suivi d'une ligation à haute dilution, pour favoriser la ligation intramoléculaire. Si les fragments générés ne sont pas cohésifs, on remplit les extrémités avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I; la paire de sites choisis est telle qu'au moins un des sites de restriction soit reconstitué (Maniatis et al., 1982). Un ug de plasmide est digéré dans 10 ul puis l'ADN est dilué à 100 ul avec du tampon de ligation contenant 10 U de ligase de T4. On incube 16 hrs à 16°C puis on transforme des JM109

compétentes avec 10 ul du mélange de ligation. De l'ADN est préparé à partir de colonies uniques et la taille des sous-clones est comparée à celle du clone parental sur gel horizontal d'agarose 1.3%.



## RESULTATS

La première étape du projet consistait à tester la possibilité d'hybridation croisée entre les métallothionéines de souris et de lapin. Les sondes MT utilisées ont été pMMT2.2 qui possède le fragment *Ava*II de 220 pb, de l'ADNc de MT-I de souris cloné dans le site *Sma*I de pUC13 (résultats non-présentés), et pMMT1.6 qui possède le fragment *Rsa*I de 160 pb de l'ADNc de MT-II de souris cloné dans le site *Xba*I de pUC12 (don de Richard Palmiter). L'insertion de pMMT2.2 couvre toute la région codante de la MT-I ainsi que 40 nucléotides en 3'. L'insertion de pMMT1.6 couvre les 15 derniers nucléotides du second exon et s'étend 50 nucléotides en 3' du codon de terminaison de la MT-II. Il a été impossible de révéler des bandes chez le lapin avec les sondes MT de souris dans les conditions d'hybridation utilisées chez la souris; la stringence de l'hybridation a donc été réduite.

De l'ADN de foie de lapin de Nouvelle-Zélande a été isolé avec un rendement de 250 ug d'ADN par gramme de foie. La taille de l'ADN non-digéré était de 25 Kb à 35 Kb. L'ADN de lapin a été digéré par *Bgl*II, *Bcl*I, *Bam*HI et *Eco*RI (Fig. 2I) et hybridé avec une sonde MT-I préparée à la polymérase du phage T4 (Fig. 2II). La sonde MT-I révèle dix bandes dans l'ADN de lapin digéré par *Eco*RI (1.6 Kb, 2.0 Kb, 2.4 Kb, 2.5 Kb, 3.3 Kb, 3.5 Kb, 4.4 Kb, 4.5 Kb, 8.5 Kb, 9.6 Kb) (puit E). Des bandes de 1.6 Kb, 3.4 Kb et 4.1 Kb sont révélées dans l'ADN de souris digéré par *Eco*RI (puit F). Il faut noter que la sonde a illuminé les marqueurs de poids moléculaire (puits A et H) ce qui indique une hybridation non-spécifique; de plus, les bandes de 1 Kb Ladders dérivées

FIGURE 2. BUVARDAGES DE L'ADN GENOMIQUE DE LAPIN.

A:  $\lambda$ /HindIII, B: ADN de lapin/BglII, C: ADN de lapin/BclI, D: ADN de lapin/BamHI, E: ADN de lapin/EcoRI, F: ADN de souris/EcoRI, G: pMMT2.2/BglI, H: 1 Kb Ladders (BRL). I: photographie du gel. II: autoradiogramme de l'ADN hybridé avec une sonde faite à la polymérase de T4 sur pMMT2.2; activité spécifique:  $5 \times 10^8$  cpm/ug, 8 jours d'exposition. III: autoradiogramme de l'ADN hybridé avec une sonde par déplacement d'encoche sur pMMT1.6. Activité spécifique:  $2 \times 10^8$  cpm/ug, 7 jours d'exposition. IV: autoradiogramme de l'ADN hybridé avec une sonde par déplacement d'encoche sur le clone purifié  $\lambda$ RMT48; activité spécifique:  $5 \times 10^8$  cpm/ug, 1 jour d'exposition. La taille des marqueurs de poids moléculaire est exprimée en Kb.

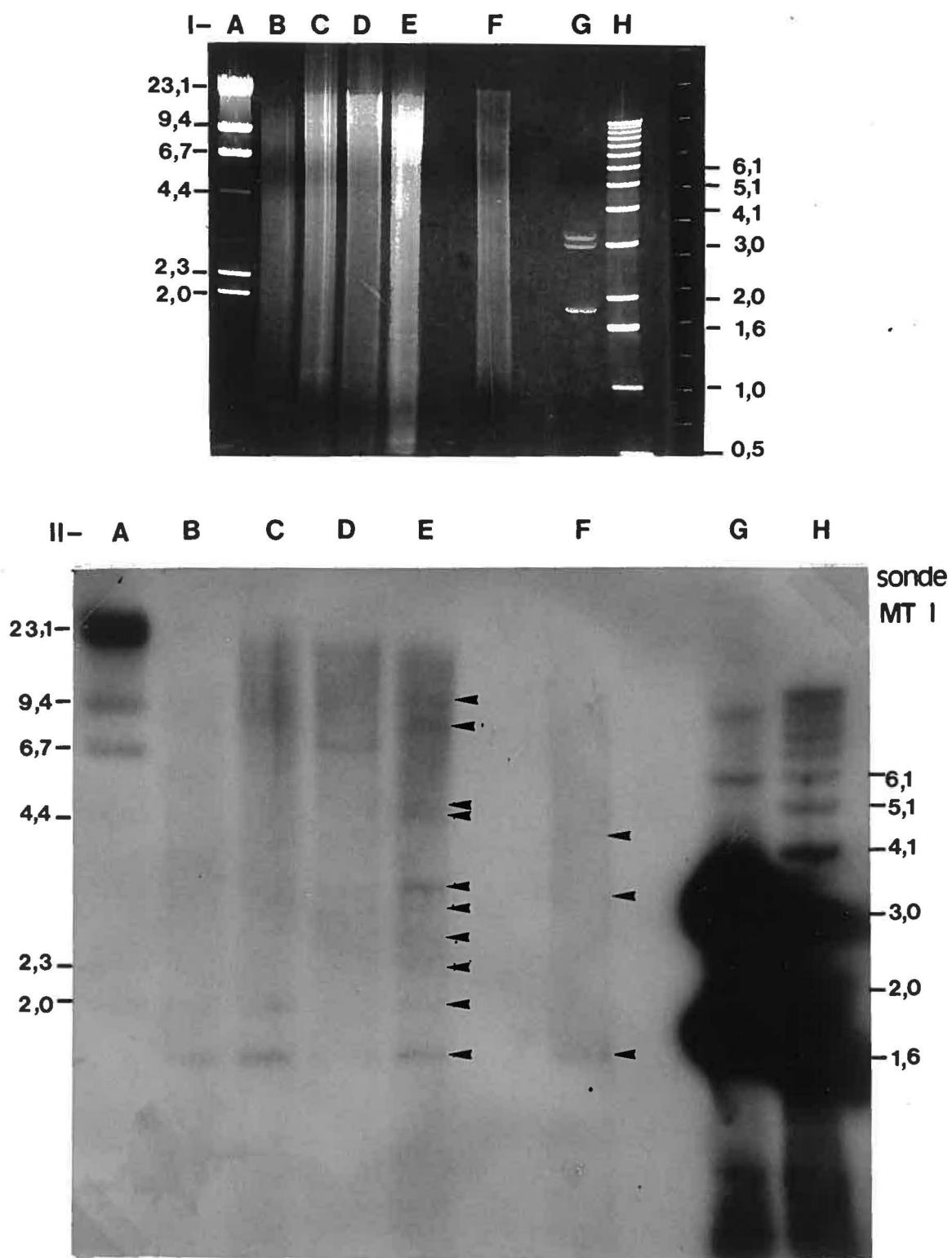


Figure 2

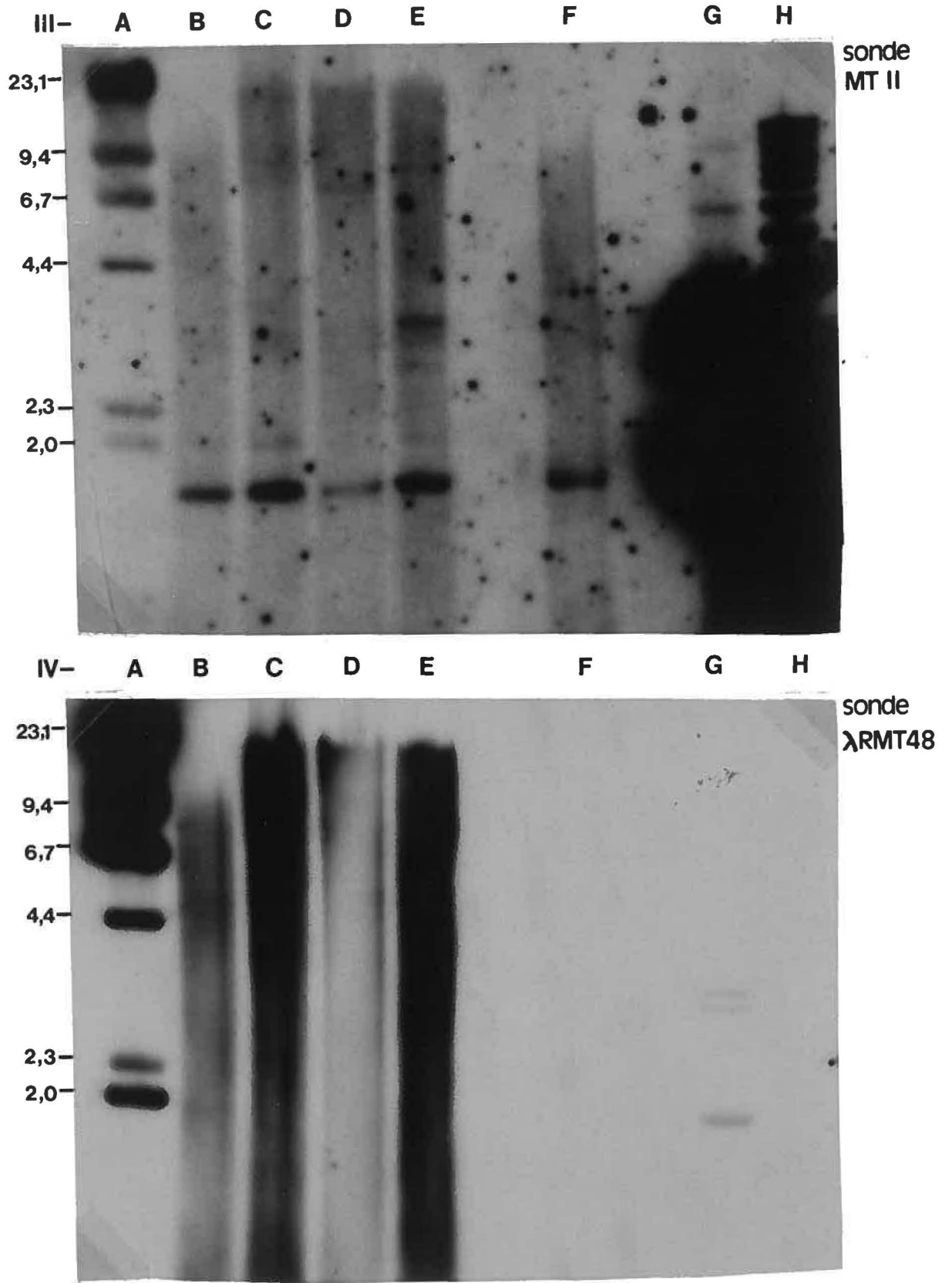


Figure 2 (Suite)

de pBr322 (puit F) ont été fortement illuminées ce qui montre que la sonde contenait du vecteur marqué. L'ADN de lapin hybridé avec une sonde MT-II préparée par déplacement d'encoche (Fig. 2III) révèle essentiellement les mêmes bandes que la sonde MT-I sauf que les bandes EcoRI de 1.6 Kb et 3.5 Kb deviennent proportionnellement plus intenses (puit E). La Figure 2IV montre que le même gel hybridé avec  $\lambda$  RMT48, un des clones isolé donne des trainées dans l'ADN de lapin digéré par BglII, BclI et EcoRI (puits B, C, E) mais pas par BamHI (puit D) ce qui indique que  $\lambda$  RMT48 possède de l'ADN hautement répétitif. La sonde  $\lambda$  RMT48 illumine pMMT2.2 (puit G) mais pas les bandes de 1 Kb Ladders dérivées de pBr322 (puit H) démontrant que l'hybridation observée provient de l'insertion de pMMT2.2. L'ADN de souris n'hybride pas avec  $\lambda$  RMT48 (puit F) ce qui indique que  $\lambda$  RMT48 possède de l'ADN hautement répétitif particulier au lapin.

Puisque l'ADN de lapin possède plusieurs bandes EcoRI pouvant être révélées par une sonde MT-I de souris, et pouvant être acceptées par le vecteur  $\lambda$ gt-10 (<7.5 Kb), une banque génomique a été construite dans ce vecteur. De l'ADN de  $\lambda$ gt-10 a été préparé avec un rendement de 1 mg par litre de milieu de culture. Des extraits d'encapsidation in vitro ont été préparés et le rapport molaire vecteur: insertion a été optimisé pour la construction de la banque. Le rapport molaire vecteur: insertion de 2:1 est celui qui a donné le plus grand nombre de recombinants ( $5.7 \times 10^5$  recombinants par  $\mu$ g d'ADN ligaturé); le vecteur coupé par EcoRI, puis ligaturé n'a donné que  $3 \times 10^4$  pfu par  $\mu$ g d'ADN sur la souche de sélection C600 Hfl, ce qui ne correspond qu'à 5% du nombre obtenu en présence d'ADN de lapin. La banque a été construite et un total de  $1 \times 10^6$  recombinants ont été générés. La moitié de la banque

FIGURE 3. CRIBLAGE DE LA BANQUE GENOMIQUE DE LAPIN.

I: Autoradiogramme du premier criblage; sonde MT-I à la T4 polymérase, activité spécifique:  $2 \times 10^8$  cpm/ug, 7 jours d'exposition. II: Autoradiogramme du troisième criblage; sonde MT-I par déplacement d'encoche, activité spécifique:  $5 \times 10^8$  cpm/ug, 4 jours d'exposition. III: Autoradiogramme du dernier criblage; sonde MT-I par déplacement d'encoche, activité spécifique:  $1 \times 10^8$  cpm/ug, 2 jours d'exposition.

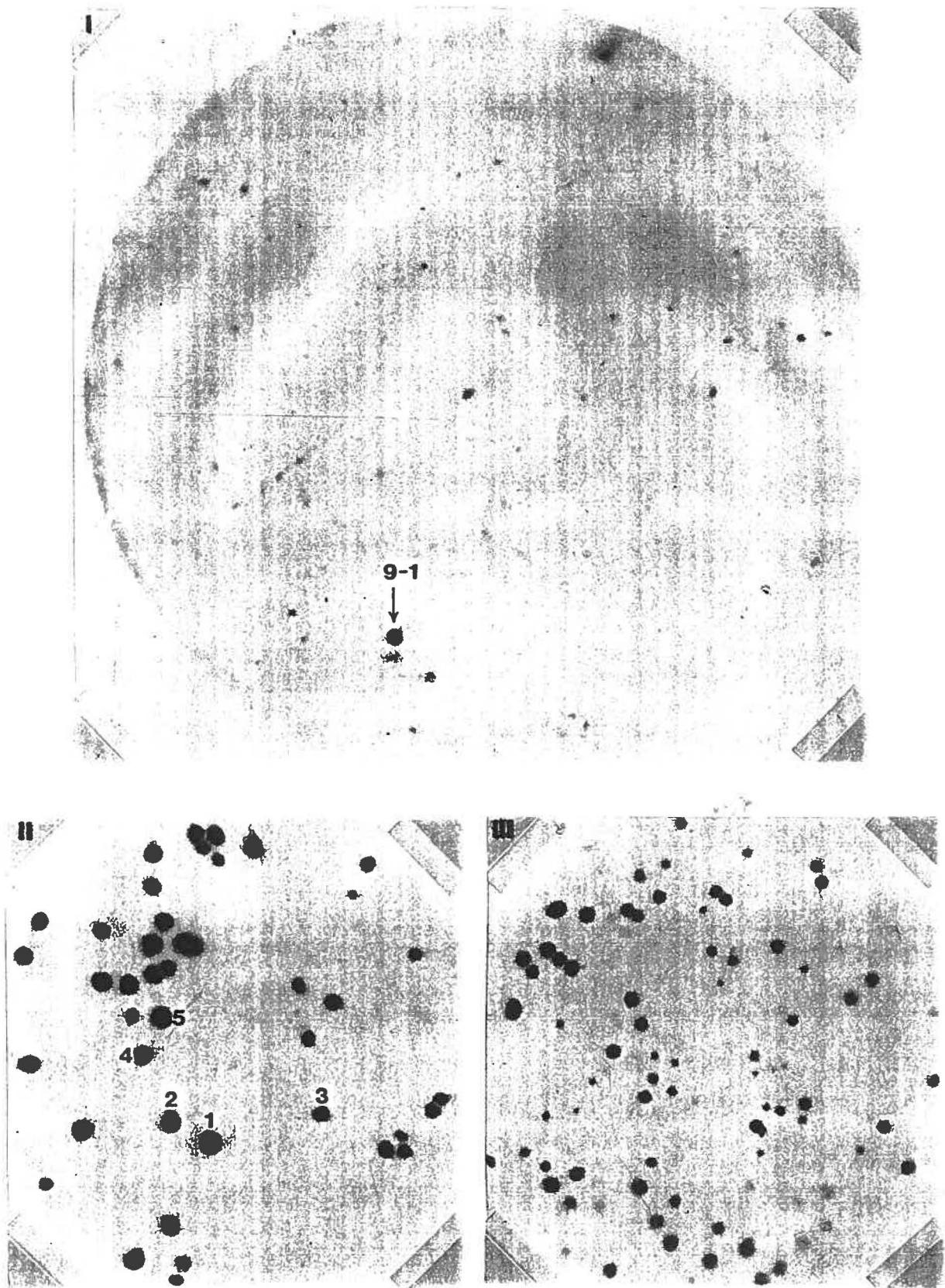


Figure 3

( $5.2 \times 10^5$  pfu) a été amplifiée et un total de  $5.1 \times 10^{12}$  pfu ont été obtenus. L'autre moitié de la banque ( $4.8 \times 10^5$  pfu) a été criblée avec une sonde préparée à la polymérase du phage T4 sur pMMT2.2 et huit candidats ont été obtenus. Un exemple de criblage est montré à la Figure 3.

De l'ADN des huit candidats a été préparé puis coupé par EcoRI pour exciser les insertions (Fig. 4I). L'ADN a été buvardé et hybridé avec une sonde MT-I préparée à la polymérase du phage T4 (Fig. 4II) ainsi qu'une sonde par déplacement d'encoche sur pUC13 (Fig. 4III). La sonde MT-I révèle la bande EcoRI de 4.1 Kb dans l'ADN de souris (Fig. 4II, puit J) qui correspond au fragment portant le gène de la MT-I, alors qu'elle révèle huit bandes dans l'ADN de lapin (Fig. 4II, puit I); des bandes sont de taille comparable à celles obtenues à la Figure 2II (puits E). Les bandes indiquées par des traits à la Figure 4II, puits I sont nettement plus visibles sur l'autoradiogramme original. La sonde MT-I révèle des bandes de 4.5 Kb, 4.8 Kb, 4.4 Kb et 1.7 Kb chez les candidats 11-1, 10-1, 9-1 et 7-1 (Fig. 4II, puits C, D, E, G). Des bandes de 4.4 Kb et 4.8 Kb sont présentes dans l'ADN de lapin (puits I) alors que la bande de 1.7 Kb est absente. La sonde pUC13 illumine une bande de 1.6 Kb chez le candidat 12-2 (Fig. 4III, puits A) qui n'est pas révélée par la sonde MT-I. La faible intensité des bandes observées chez les candidats par rapport à l'ADN génomique de lapin s'explique par le fait que les candidats, à ce stade de purification, ne représentent qu'environ 0.1% des phages présents et les insertions ne correspondent qu'à 10% de la masse d'ADN totale, il y a donc environ 100 pg d'ADN par phage ce qui est de même ordre de grandeur que la quantité d'ADN présente dans les 20 ug d'ADN génomique de lapin sur le gel. Les



FIGURE 4. BUVARDAGE SUR LES CANDIDATS DU PREMIER CRIBLAGE.

A: 12-2/EcoRI, B: 12-1/EcoRI, C: 11-1/EcoRI, D: 10-1/EcoRI, E: 9-1/EcoRI, F: 7-2/EcoRI, G: 7-1/EcoRI, H: 5-1/EcoRI, I: ADN de lapin/EcoRI, J: ADN de souris/EcoRI, K:  $\lambda$ /HindIII (BRL). I: photographie du gel. II: Autoradiogramme de l'ADN hybridé avec une sonde MT-I à la T4 polymérase; activité spécifique:  $5 \times 10^8$  cpm/ug, 10 jours d'exposition. III: Autoradiogramme de l'ADN hybridé avec une sonde pUC13 par déplacement d'encoche; activité spécifique:  $5 \times 10^8$  cpm/ug, 7 jours d'exposition. La taille des marqueurs de poids moléculaire et des bras de  $\lambda$ gt-10 est exprimée en Kb.

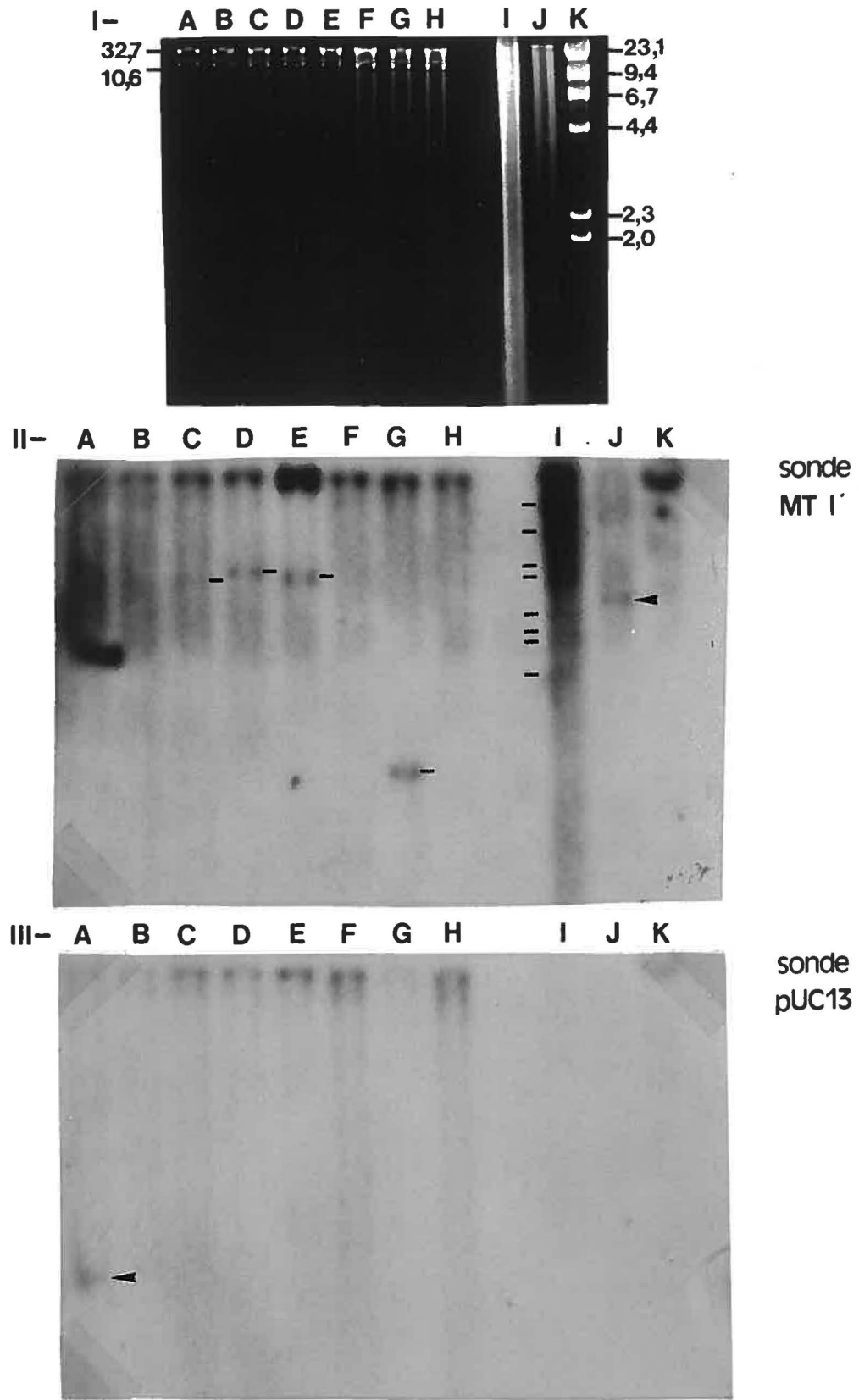


Figure 4

candidats 7-1, 9-1, 10-1 et 11-1 ont été choisis pour purification complète par deux cycles de criblage supplémentaires. Les clones purifiés ont été étalés à basse densité pour démontrer que toutes les plages hybridaient avec une sonde MT-I. De l'ADN des quatre clones purifiés a été préparé avec un rendement de 1 à 2 mg d'ADN par litre de milieu.

Une carte de restriction sommaire des clones purifiés a été dressée pour les enzymes EcoRI, XhoI, HindIII, BglII, SmaI, et BamHI dont la position est connue sur le vecteur  $\lambda$ gt-10 (Fig. 5). Les clones purifiés ont été digérés par ces enzymes (Fig. 6I, 7I, 8I) buvardés, puis hybridés avec une sonde MT-I (Fig. 6II, 7II, 8II), une sonde MT-II (Fig. 6III, 7III, 8III)) et une sonde sur l'ADN total de lapin pour pouvoir détecter les séquences hautement répétitives (Fig. 6IV, 7IV, 8IV). La stringence de l'hybridation a été augmentée par un lavage supplémentaire dans de l'eau déionisée pour éviter l'hybridation non-spécifique avec le vecteur. Les digestions par EcoRI des clones permettent d'exciser les insertions et montrent que les clones 7-1, 9-1, 10-1 et 11-1 ont des insertions de 5.1 Kb, 4.4 Kb, 4.8 Kb et 4.5 Kb respectivement (Fig. 6I puits B, C, D, E). Il faut remarquer que la taille de l'insertion du clone 7-1 n'est pas la même qui avait été observée à la Figure 4II (puits G). Les clones hybrident tous avec la sonde MT-II (Fig. 6III, puits B, C, C, E) alors que le clone 10-1 hybride beaucoup plus faiblement avec la sonde MT-I que les autres clones (Fig. 6II, puits B, C, D, E). Les quatre clones possèdent de l'ADN hautement répétitif (Fig. 6IV, puits B, C, D, E). La stringence accrue du lavage a éliminé l'hybridation non-spécifique avec le vecteur puisqu'aucune hybridation n'est visible avec les fragments de  $\lambda$ gt-10 ne

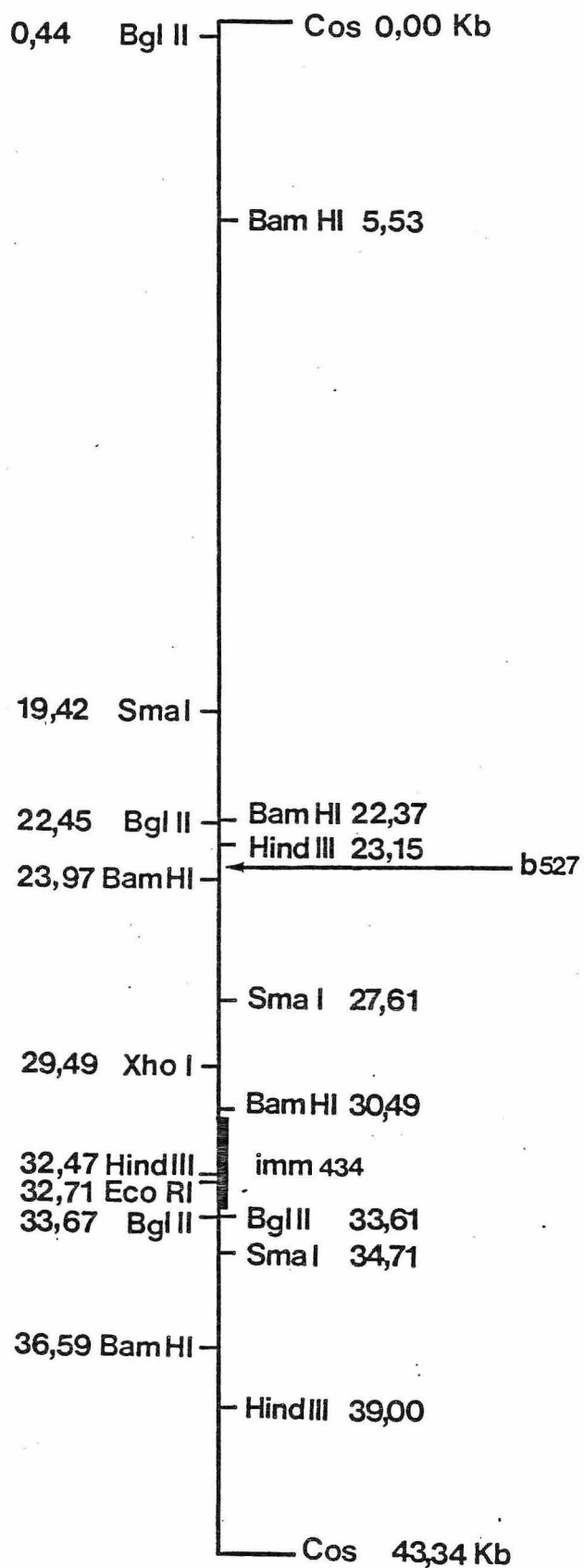
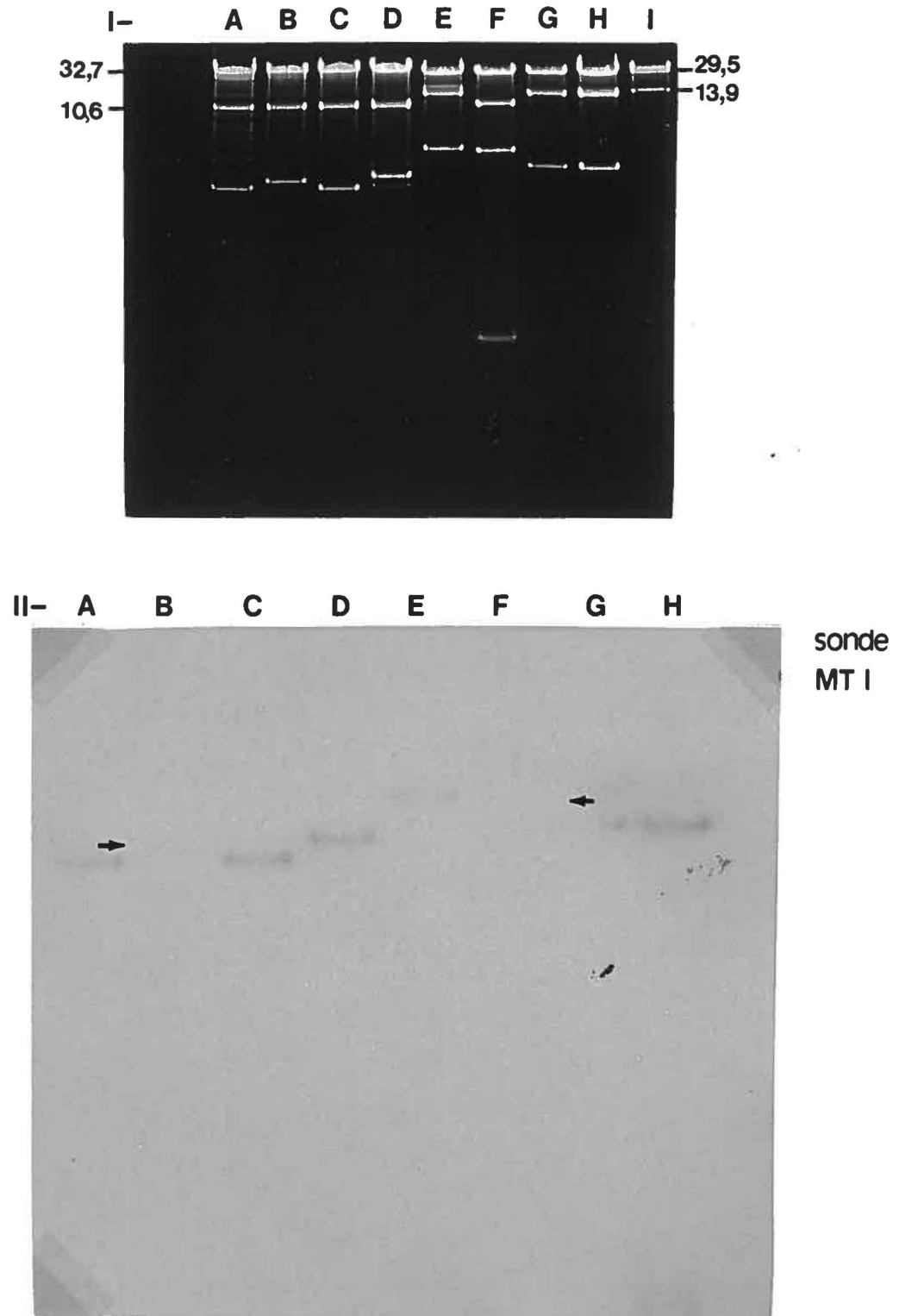


Figure 5: Carte de Restriction de  $\lambda$ gt-10

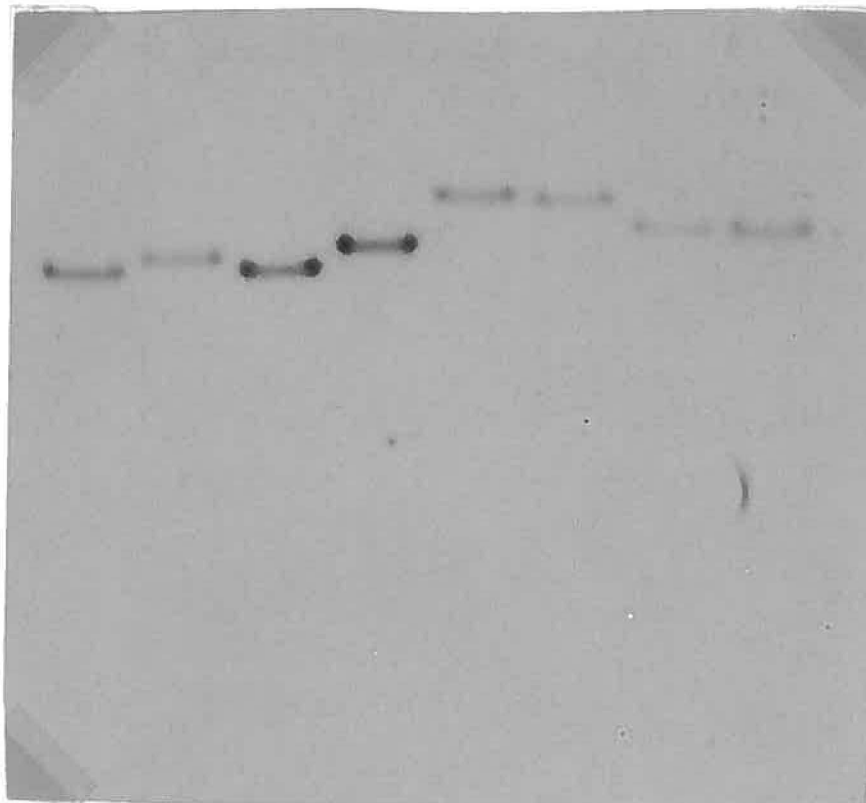
FIGURE 6. SEPARATION ELECTROPHORETIQUE ET BUVARDAGE DES FRAGMENTS DE  
RESTRICTION (EcoRI et XhoI) DES CLONES PURIFIES.

A: 11/EcoRI, B: 10/EcoRI, C: 9/EcoRI, D: 7/EcoRI, E: 11/XhoI, F: 10/XhoI,  
G: 9/XhoI, H: 7/XhoI, I:  $\lambda$ gt-10/XhoI. I: photographie du gel. II: sonde  
par déplacement d'encoche sur pMMT2.2; activité spécifique:  
 $2 \times 10^8$  cpm/ug, 2 jours d'exposition. III: sonde par déplacement d'encoche  
sur pMMT1.6; activité spécifique:  $2 \times 10^8$  cpm/ug, 2 jours d'exposition.  
IV: sonde par déplacement d'encoche sur l'ADN total de lapin; activité  
spécifique:  $3 \times 10^8$  cpm/ug, 3 jours d'exposition. La taille des fragments  
de restriction de  $\lambda$ gt-10 n'ayant pas d'insertion est exprimée en Kb.



**Figure 6**

III- A B C D E F G H

sonde  
MT II

IV- A B C D E F G H

sonde  
ADN  
total de  
Lapin

Figure 6 (Suite)

portant pas d'insertion. Les sondes, MT-I et MT-II illuminent les mêmes bandes pour tous les clones (Fig. 6II, III; 7II, III; 8II, III). Les insertions des clones 11-1, 9-1 et 7-1 (Fig. 6I, puits E, G, H) ont un site XhoI unique alors que le clone 10-1 en possède deux (Fig. 6I, puit F). Les fragments XhoI illuminés par les sondes MTs (Fig. 6II, III) sont les suivants: 11-1: 6.4 Kb (puits I); 10-1: 6.3 Kb (puits F); 9-1: 5.1 Kb (puits G); 7-1: 5.1 Kb (puits H). La sonde d'ADN total de lapin (Fig. 6IV) hybride avec les bandes suivantes: 11-1: 30 Kb, 14 Kb, 6.4 Kb (puits E); 10-1: 6.3 Kb, 1.5 Kb (puits F); 9-1: 30 Kb, 14 Kb (puits G); 7-1: 30 Kb, 14 Kb (puits H). Les régions d'ADN répétitif sont donc séparées des régions homologues aux MTs par un site XhoI dans les clones 7-1 et 9-1.

Les digestions par HindIII (Fig. 7I, puits J, K, L, M) génèrent cinq fragments dans tous les clones indiquant que les insertions possèdent un site HindIII (une bande faible est visible dans le puit K au bas du gel, alors que la bande située à 4.3 Kb dans le puit M est un doublet). Les digestions par BglII (Fig. 7I) montrent que les clones 9-1 et 7-1 possèdent un site unique BglII, dans l'insertion (puits P et Q) alors que le clone 10-1 en possède trois (puits O) et le clone 11-1 en possède deux (puits N). (Des bandes faibles sont visibles au bas du gel dans les puits O et N). Les sondes MTs (Fig. 7II, III) révèlent les bandes HindIII suivantes: 11-1: 4.6 Kb, (puits J); 10-1: 10.6 Kb (puits K); 9-1: 3.6 Kb (puits L), 7-1: 4.3 Kb (puits M) et les bandes BglII suivantes: 11-1: 16 Kb (puits N); 10-1: 1.5 Kb (puits O); 9-1: 15 Kb (puits P); 7-1: 15 Kb (puits Q). La sonde sur l'ADN total de lapin (Fig. 7IV) révèle les bandes HindIII suivantes: 11-1: 7.7 Kb, 4.6 Kb (puits J); 10-1: 10.6 Kb (puits K); 9-1: 7.5 Kb, 3.6 Kb (puits L); 7-1: 7.5 Kb, 4.3 Kb (puits M) et les bandes BglII suivantes: 11-1: 16 Kb, 1.2 Kb (puits



FIGURE 7. SEPARATION ELECTROPHORETIQUE ET BUVARDAGE DES FRAGMENTS DE RESTRICTION (HindIII et BglII) DES CLONES PURIFIES.

J: 11/HindIII, K: 10/HindIII, L: 9/HindIII, M: 7/HindIII, N: 11/BglII, O: 10/BglII, P: 9/BglII, Q: 7/BglII, r: $\lambda$ gt-10/BglII. I: photographie du gel. II: sonde par déplacement d'encoche sur pMMT2.2; activité spécifique:  $2 \times 10^8$  cpm/ug, 2 jours d'exposition. III: sonde par déplacement d'encoche sur pMMT1.6; activité spécifique:  $2 \times 10^8$  cpm/ug, 2 jours d'exposition. IV: sonde par déplacement d'encoche sur l'ADN total de lapin; activité spécifique:  $3 \times 10^8$  cpm/ug, 3 jours d'exposition. La taille des fragments de restriction de  $\lambda$ gt-10 n'ayant pas d'insertion est exprimée en Kb.

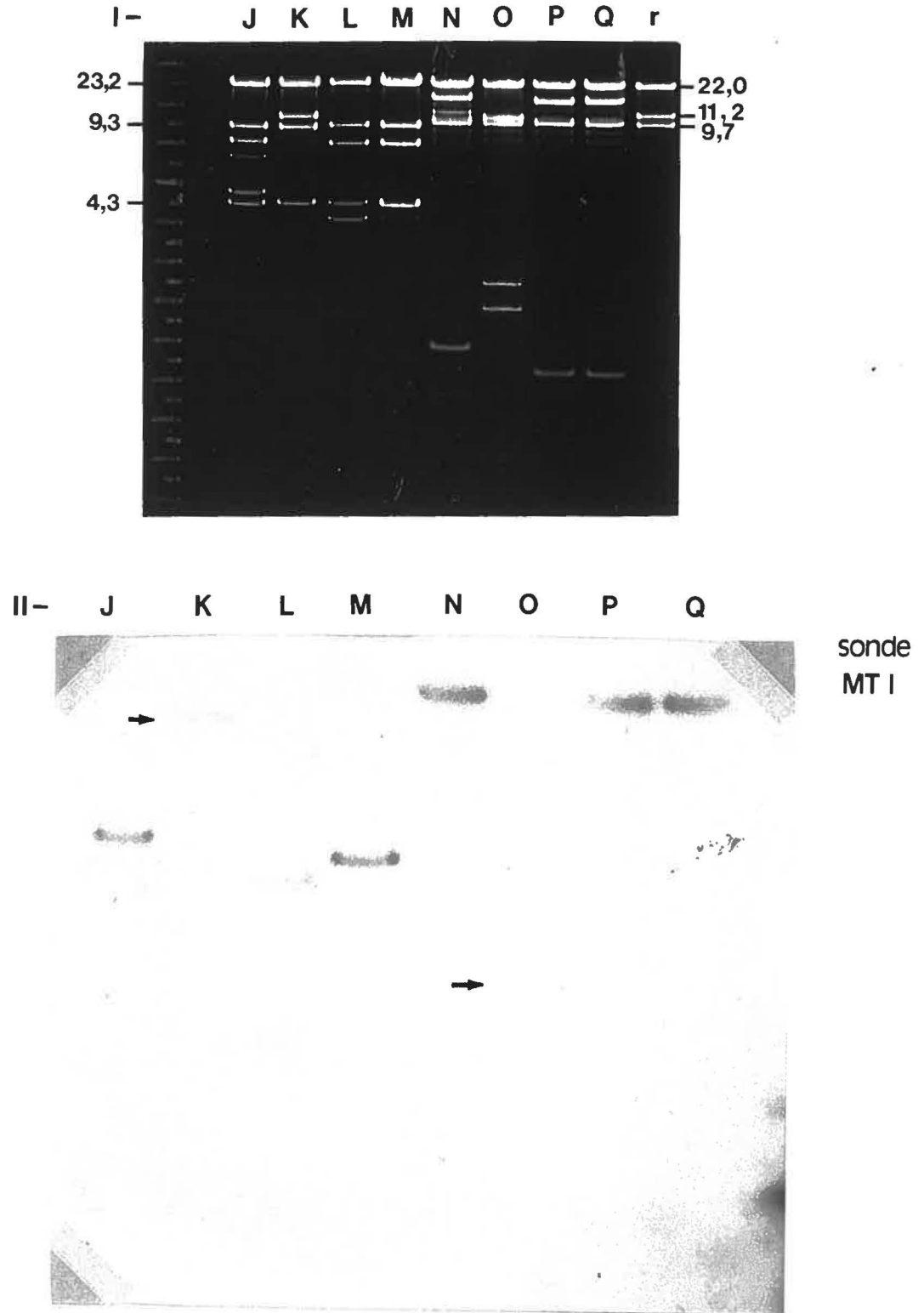
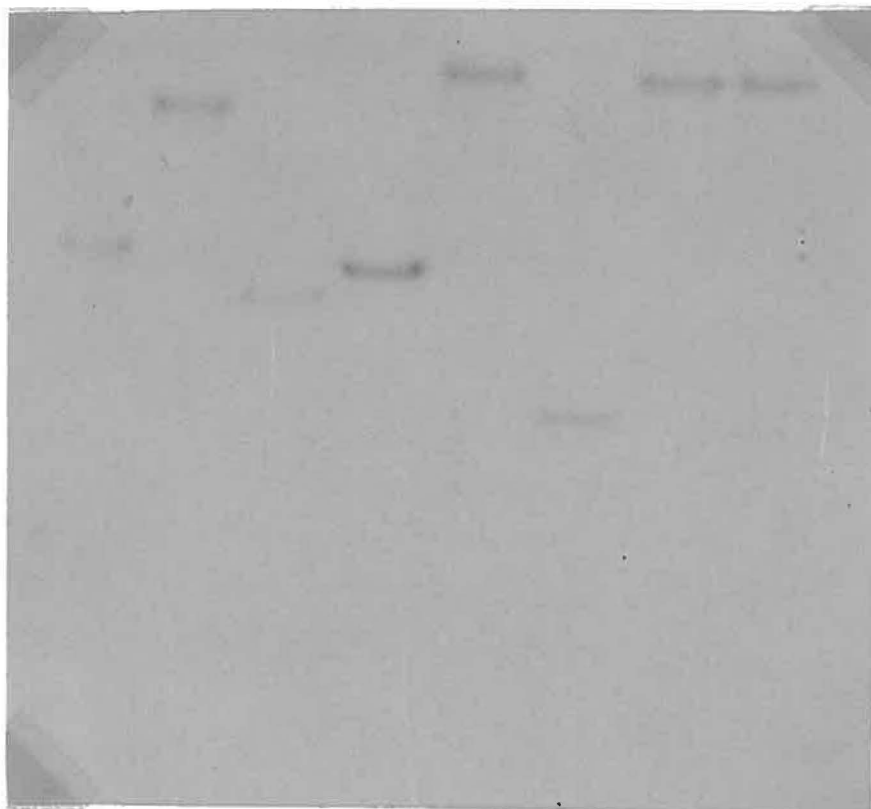


Figure 7

III- J K L M N O P Q

sonde  
MT II

IV- J K L M N O P Q

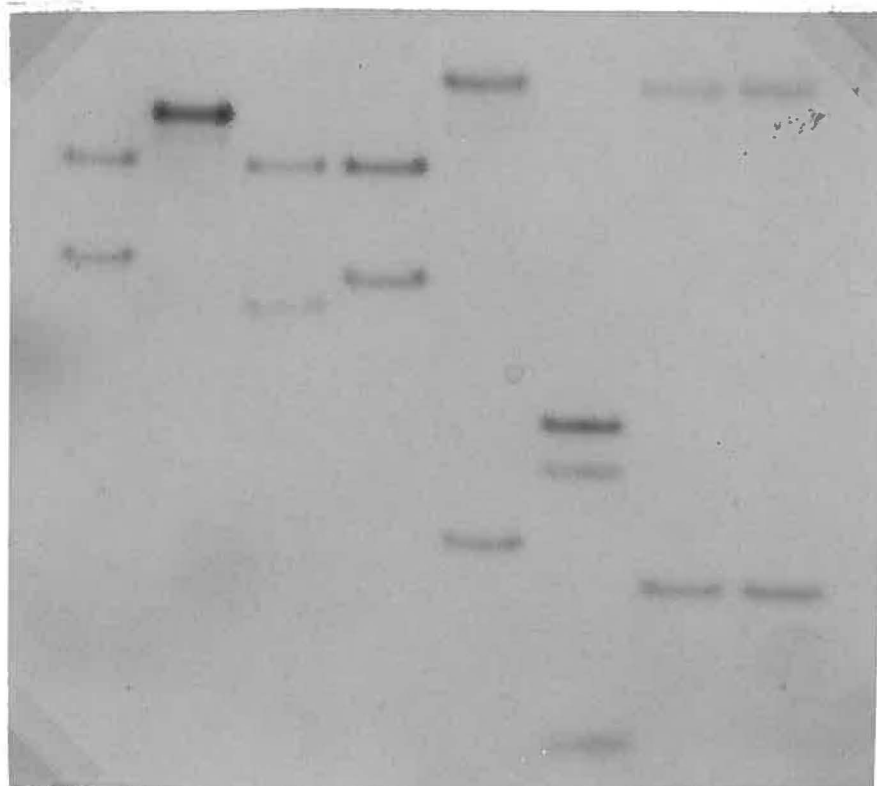
sonde  
ADN  
total de  
Lapin

Figure 7 (Suite)

N); 10-1: 1.5 Kb, 1.3 Kb, 0.7 Kb (puits O); 9-1: 15 Kb, 1.1 Kb (puits P); 7-1: 15 Kb, 1.1 Kb (puits Q). Dans tous les cas, les bandes homologues aux sondes MTs possèdent de l'ADN répétitif.

Les digestions par SmaI (Fig. 8I) montrent que les clones 11-1 et 10-1 possèdent deux sites SmaI (puits R et S) alors que les clones 9-1 et 7-1 en possèdent un (puits T et U). Les digestions par BamHI montrent que le clone 10-1 possède trois sites BamHI (puits W) alors que ce site est absent des clones 11-1, 9-1 et 7-1 (puits V, X et Y). Les sondes MTs (Fig. 8II, III) révèlent les bandes SmaI suivantes: 11-1: 1.6 Kb (puits R); 10-1: 3.5 Kb (puits S); 9-1: 6.8 Kb (puits T); 7-1: 6.8 Kkb (puits U) et les bandes BamHI suivantes: 11-1: 12 Kb (puits V); 10-1: 1.7 Kb (puits W); 9-1: 11 Kb (puits X); 7-1: 11 Kb (puits Y). La sonde d'ADN total de lapin illumine les bandes SmaI suivantes: 11-1 :6.5 Kb, 4.6 Kb (puits R); 10-1: 6.3 Kb, 3.5 Kb, 2.7 Kb (puits); 9-1: 4.5 Kb (puits T); 7-1: 4.8 Kb (puits U) et les bandes BamHI suivantes: 11-1: 12 Kb (puits V); 10-1: 6.3 Kb, 3.0 Kb, 1.7 Kb (puits W); 9-1: 11 Kb (puits X); 7-1: 11 Kb (puits Y). Les régions homologues aux MTs sont donc situées sur des fragments SmaI différents de ceux qui contiennent de l'ADN répétitif pour les clones 7-1, 9-1 et 11-1. Les clones 7-1 et 9-1 ont un patron de restriction similaire, la seule différence étant que le clone 7-1 est plus grand d'environ 0.3 Kb que le clone 9-1; la différence est située dans la région d'ADN répétitif du côté opposé à la région homologue aux MTs. Les fragments plus petits que 0.45 Kb sont sortis du gel puisque le fragment BglII de 0.44 Kb est absent (Fig. 7I, puits r). les clones 7-1, 9-1, 10-1 et 11-1 ont été nommés  $\lambda$  RMT51,  $\lambda$  RMT44,  $\lambda$  RMT48 et  $\lambda$  RMT45 respectivement (R: rabbit, MT: métallothionéine, chiffre: taille de l'insertion en 0.1 Kb).

FIGURE 8. SEPARATION ELECTROPHORETIQUE ET BUVARDAGE DES FRAGMENTS DE RESTRICTION (SmaI et BamHI) DES CLONES PURIFIES.

R: 11/SmaI, S: 10/SmaI, T: 9/SmaI, U: 7/SmaI, V: 11/BamHI, W: 10/BamHI, X: 9/BamHI, Y: 7/BamHI, Z:  $\lambda$ gt-10/BamHI. I: photographie du gel. II: sonde par déplacement d'encoche sur pMMT2.2; activité spécifique:  $2 \times 10^8$  cpm/ug, 2 jours d'exposition. III: sonde par déplacement d'encoche sur pMMT1.6; activité spécifique:  $2 \times 10^8$  cpm/ug, 2 jours d'exposition. IV: sonde par déplacement d'encoche sur l'ADN total de lapin; activité spécifique:  $3 \times 10^8$  cpm/ug, 3 jours d'exposition. La taille des fragments de restriction de  $\lambda$ gt-10 n'ayant pas d'insertion est exprimée en Kb.

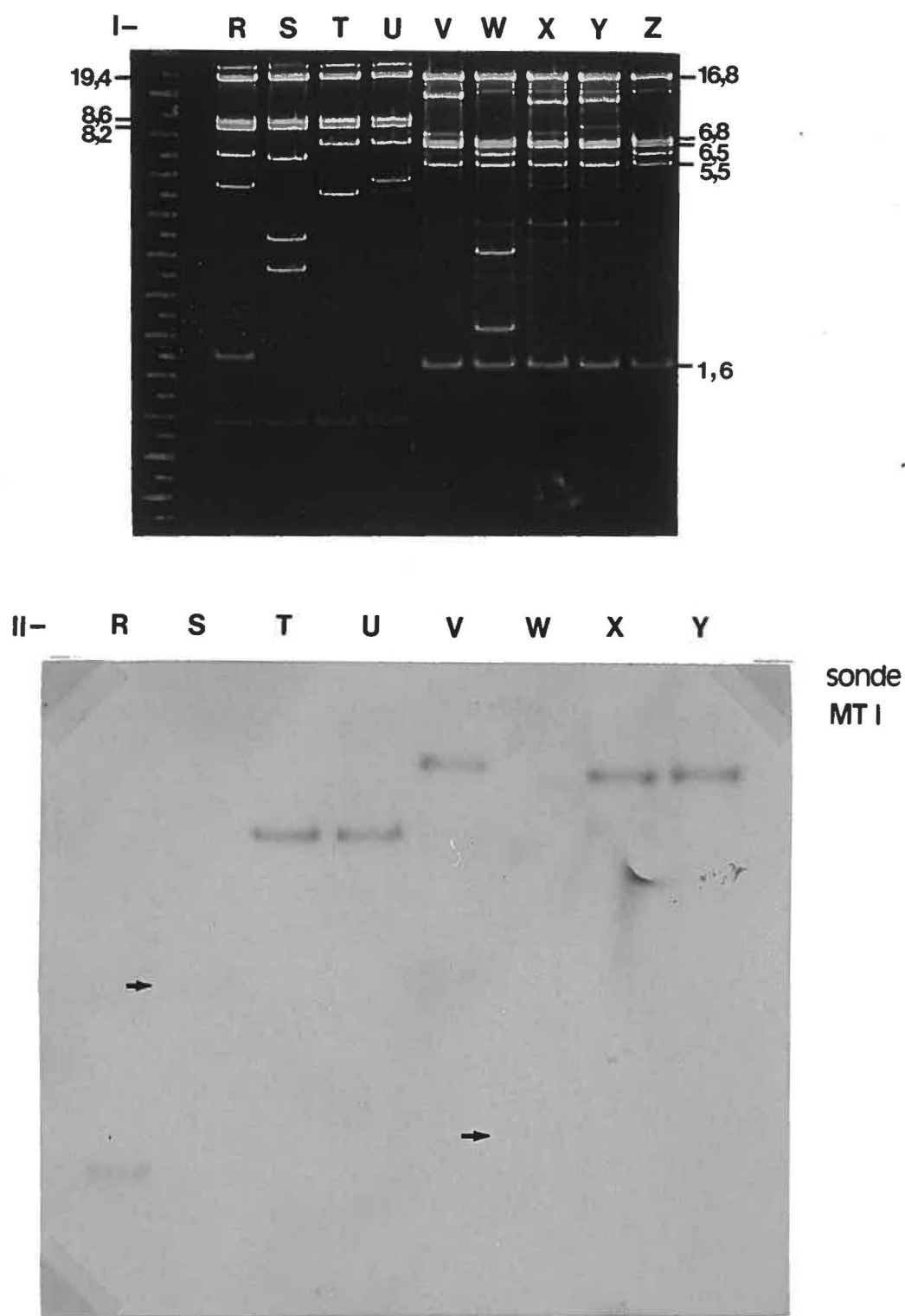
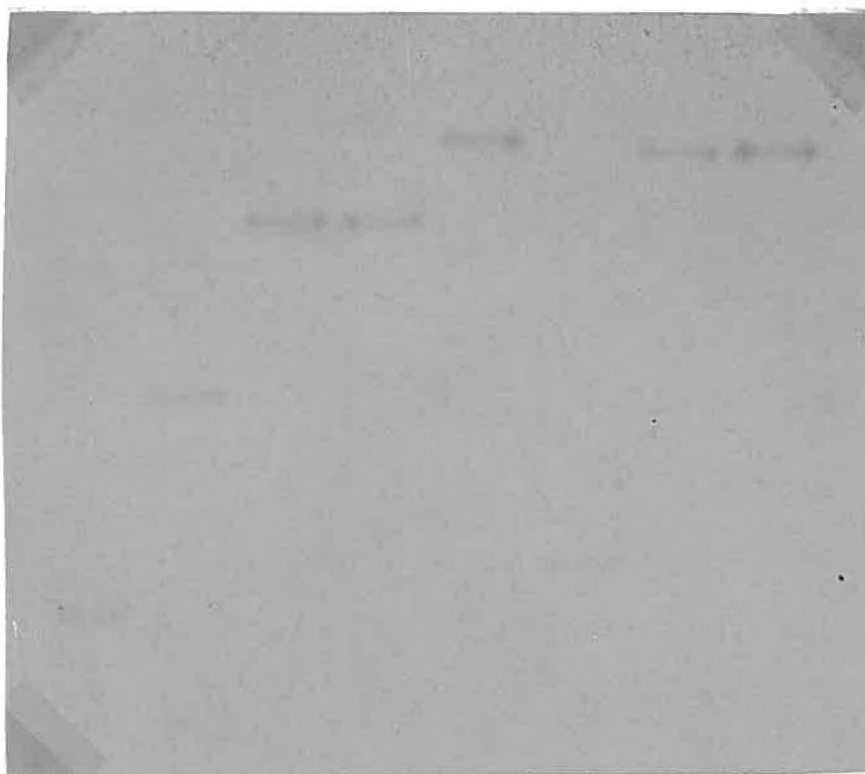


Figure 8

III- R S T U V W X Y

sonde  
MT II

IV- R S T U V W X Y

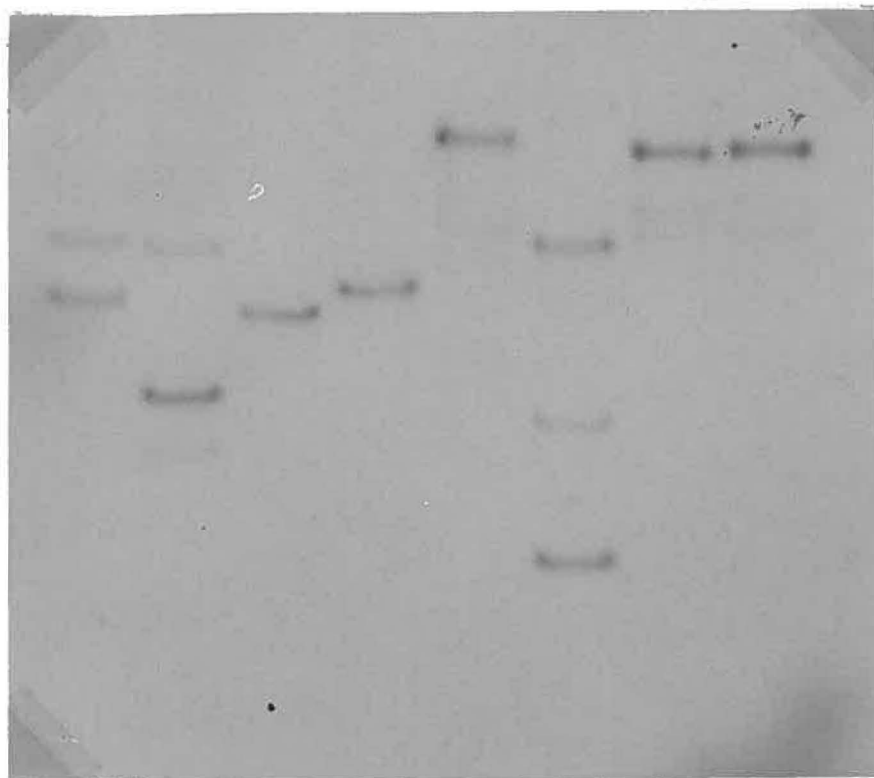
sonde  
ADN  
total de  
Lapin

Figure 8 (Suite)

Puisque que les sites connus sur  $\lambda$ gt-10 sont placés de manière asymétrique par rapport au site EcoRI, il a été possible d'évaluer la taille et la polarité des insertions. La position des sites et la taille des fragments de restriction ont été confirmés par double digestions EcoRI et un second enzyme (résultats non-présentés).

Les clones  $\lambda$ RMT44 et  $\lambda$ RMT48 ont été choisis pour une caractérisation plus poussée. Les insertions ont été sous-clonées dans le site EcoRI du vecteur pUC13. Des bactéries JM109 compétentes ont été préparées ayant une efficacité de transformation de  $7.3 \times 10^5$  transformants par  $\mu$ g de pUC13 intact. Les mélanges de transformation ont été criblés par hybridation sur colonies (Fig. 9I A, B) avec des sondes par déplacement d'encoche sur  $\lambda$ RMT44 et  $\lambda$ RMT48. Les candidats obtenus ont été réétagés puis soumis à deuxième criblage (Fig. 9II A, B). Le contrôle positif (pMMT2.2) a été fortement illuminé par les sondes alors que le contrôle négatif (pUC13) a donné un signal beaucoup plus faible par rapport aux clones positifs. L'insertion de  $\lambda$ RMT44 a été clonée dans les deux orientations possibles pour donner pRMT44+ et pRMT44-, et celle de  $\lambda$ RMT48 l'a été dans une seule orientation pour donner pRMT48+. De l'ADN de ces trois sous-clones a été préparé avec un rendement de 1 à 5 mg par litre de milieu.

Une carte de restriction détaillée de pRMT44 et pRMT48 a été dressée avec divers enzymes de restriction (simples, doubles et triples digestions) et la taille des fragments obtenus a été évaluée par comparaison avec la distance de migration des marqueurs de poids moléculaire. Le plasmide pUC13 possède huit sites uniques dans le site de clonage multiple, qui sont dans l'ordre: EcoRI, SacI, SmaI, BamHI,



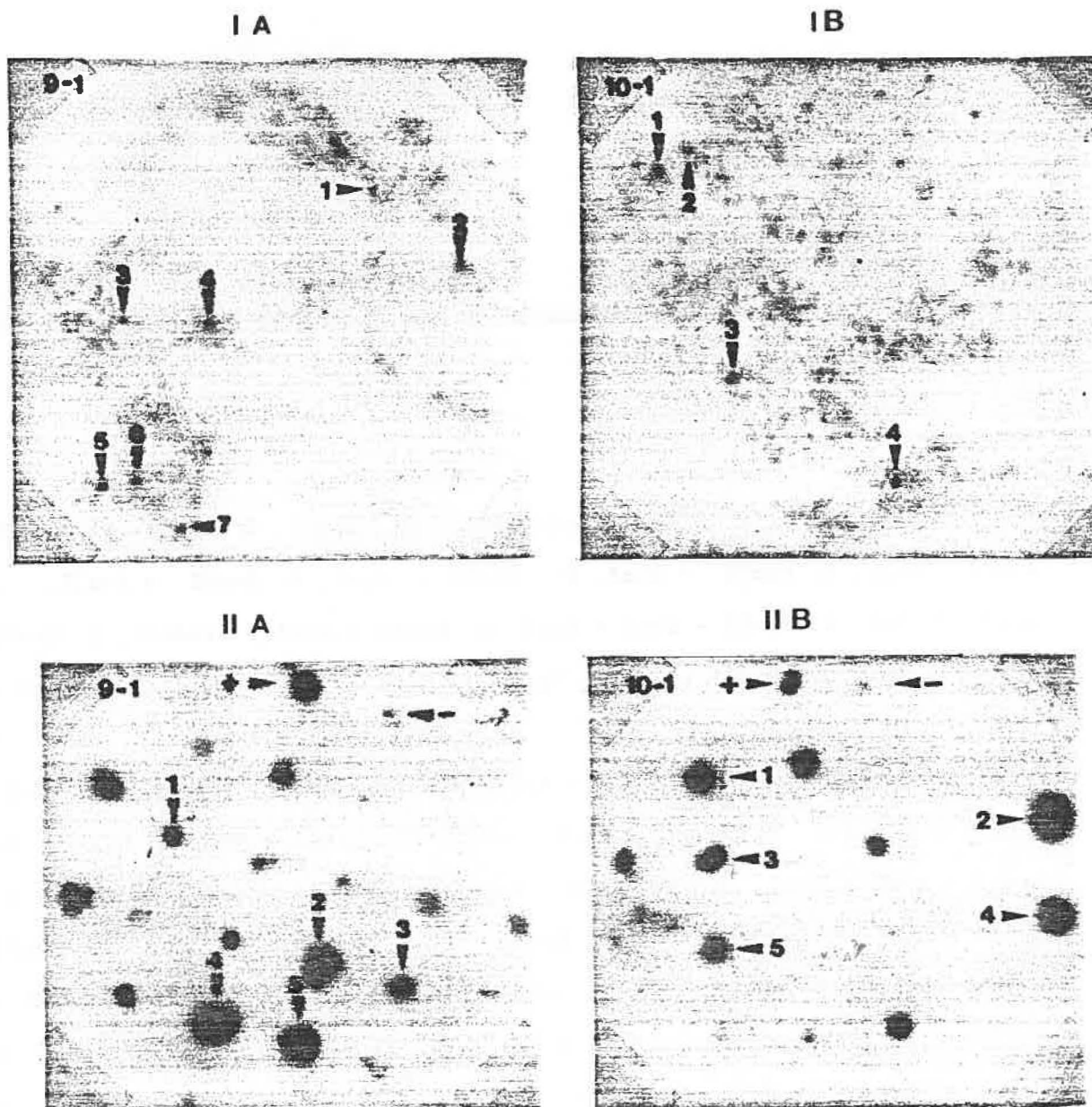


FIGURE 9. CRIBLAGE PAR HYBRIDATION SUR COLONIES.

Les insertions des phages 9-1 ( $\lambda$ RMT44) et 10-1 ( $\lambda$ RMT48) ont été clonées dans le site EcoRI de pUC13.

IA, B: premier criblage; les colonies (200 par pétri) ont été hybridées avec une sonde par déplacement d'encoche sur 9-1 (IA) et 10-1 (IB); activité spécifique:  $1 \times 10^8$  cpm/ug, 2 jours d'exposition.

IIA, B: deuxième criblage; activité spécifique  $5 \times 10^7$  cpm/ug, 2 jours d'exposition. Les contrôles négatifs (pUC13) et positifs (pMMT2.2) sont indiqués par + et -.

FIGURE 10. SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES FRAGMENTS DE RESTRICTION DE pRMT44.

A:  $\lambda$ /HindIII (BRL), H: 1 Kb Ladders (BRL), B: BamHI, C: BamHI + SacI, D: BamHI + SalI, E: BamHI + XhoI, F: BamHI + ApaI, G: BamHI + AvaII, I: EcoRI + StuI, J: EcoRI + StuI + SacI, K: EcoRI + StuI + HindIII, L: EcoRI + StuI + SmaI, M: EcoRI + StuI + BglI, N: EcoRI + StuI + ApaI, O: BamHI + KpnI, P: BamHI + SphI, Q: BamHI + BglI, R: BamHI + PvuII, S: BamHI + StuI, T: BamHI + SmaI, U: EcoRI + ApaI, V: EcoRI + ApaI + SacI, W: EcoRI + ApaI + HindIII, X: EcoRI + ApaI + SalI, Y: EcoRI + ApaI + BglII, Z: EcoRI + ApaI + XhoI. a: EcoRI, b: EcoRI + PvuI, c: EcoRI + PvuII, d: EcoRI + BglI, e: EcoRI + SalI, f: EcoRI + ApaI, g: EcoRI + BglI, h: EcoRI + BglI + SmaI, i: EcoRI + BglI + PstI, j: EcoRI + BglI + XhoI, k: EcoRI + BglI + HindIII, l: EcoRI + BglI + ApaI, m: EcoRI + HindIII, n: EcoRI + SalI, o: EcoRI + BglII, p: EcoRI + PstI, q: EcoRI + SmaI, r: EcoRI + SphI, s: EcoRI + AvaII, t: EcoRI + AvaII + SmaI, u: EcoRI + AvaII + PstI, v: EcoRI + AvaII + SacI, w: EcoRI + BglI + PvuII, x: EcoRI + BglI + SphI.

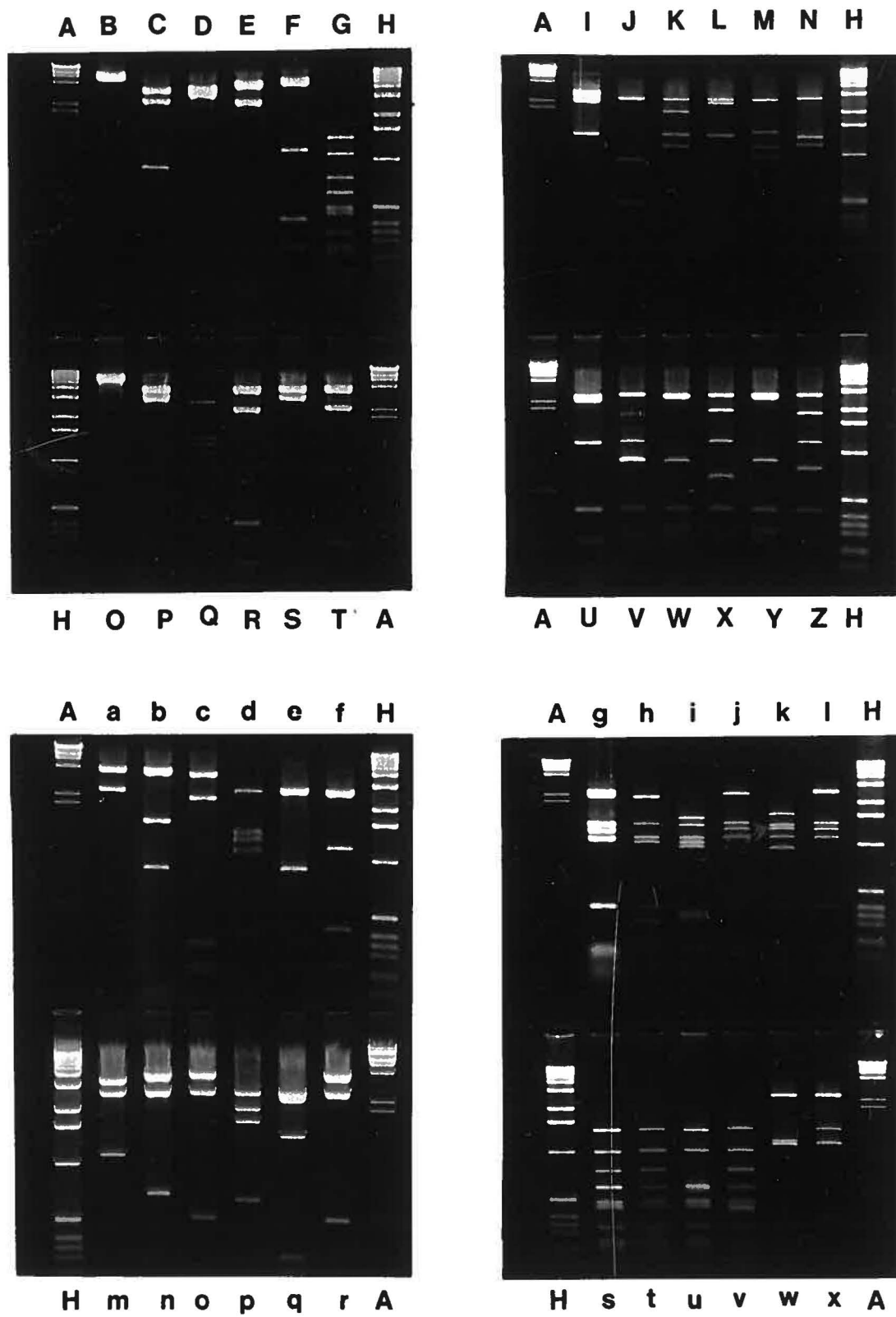


Figure 10

XbaI, SalI, PstI, et HindIII; les insertions ayant été clonées dans le site EcoRI, tous les autres sites sont situés du même côté de l'insertion. Les digestions par EcoRI permettent d'exciser les insertions alors que les digestions par des enzymes qui ne coupent pas dans l'insertion mais coupent dans le site de clonage multiple (BamHI pour pRMT44) permettent d'identifier la polarité des fragments. Par exemple, la double digestion par EcoRI et StuI donne des fragments de 3.1 Kb, 2.8 Kb et 1.3 Kb (puit I) alors que la double digestion par BamHI et StuI donne des fragments de 4.1 Kb et 3.1 Kb (puit S) ce qui démontre que le site StuI est placé à 1.3 Kb de l'extrémité EcoRI située du côté opposé au site de clonage multiple de pUC13. La même approche a permis de localiser les sites SalI (puits n et D) SphI (puits r et P), PvuII (puits c et R) et SmaI (puits q et T). La double digestion BamHI et SmaI (puit T) montre deux fragments de 250 pb et 200 pb qui étaient sortis du gel lors du buvardage sur les clones purifiés (Fig. 8I puit T); il est possible qu'un de ces fragments hybride avec les sondes MTs puisqu'ils sont adjacents au fragment SmaI homologue à ces sondes. Les sites de restriction plus nombreux (ApaI, BglI) ont été localisés par triples digestions par rapport aux sites uniques localisés (puits U à Z et puits g à l). Les sites PvuI (puit b) et KpnI (puit O) sont absents, de l'insertion de pRMT44. Les sites AvaII puits ont été impossibles à positionner car ils sont trop nombreux (plus de huit sites AvaII).

FIGURE 11. SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES FRAGMENTS DE RESTRICTION DE  
pRMT48.

A:  $\lambda$ /HindIII (BRL), H: 1 Kb Ladders (BRL), B: SacI, C: SacI + BamHI, D: SacI + SalI, E: SacI + XhoI, F: SacI + ApaI, G: SacI + AvaII, I: EcoRI + AvaII, J: EcoRI + AvaII + BglI, K: EcoRI + AvaII + PvuI, L: EcoRI + AvaII + XhoI, M: EcoRI + AvaII + BamHI, N: EcoRI + AvaII + PstI, O: SacI + KpnI, P: SacI + SphI, Q: SacI + BglI, R: SacI + PvuII, S: SacI + StuI, T: SacI + SmaI, U: EcoRI + KpnI, V: EcoRI + KpnI + AvaII, W: EcoRI + KpnI + BglI, X: EcoRI + KpnI + XhoI, Y: EcoRI + XhoI + BglI, Z: EcoRI + XhoI + PvuII. a: EcoRI + BglI, b: EcoRI + BglI + ApaI, c: EcoRI + BglI + HindIII, d: EcoRI + BglI + SmaI, e: EcoRI + BglI + BamHI, f: EcoRI + BglI + PstI, g: EcoRI + BamHI, h: EcoRI + BglI, i: EcoRI + PstI, j: EcoRI + HindIII, k: EcoRI + SmaI, l: EcoRI + BglI, m: EcoRI + SalI, n: EcoRI + PvuI, o: EcoRI + PvuII, p: EcoRI + PvuII, q: EcoRI + PvuII + ApaI, r: EcoRI + PvuII + HindIII, s: EcoRI + PvuII + SmaI, t: EcoRI + PvuII + BamHI, u: EcoRI + PvuII + PstI.

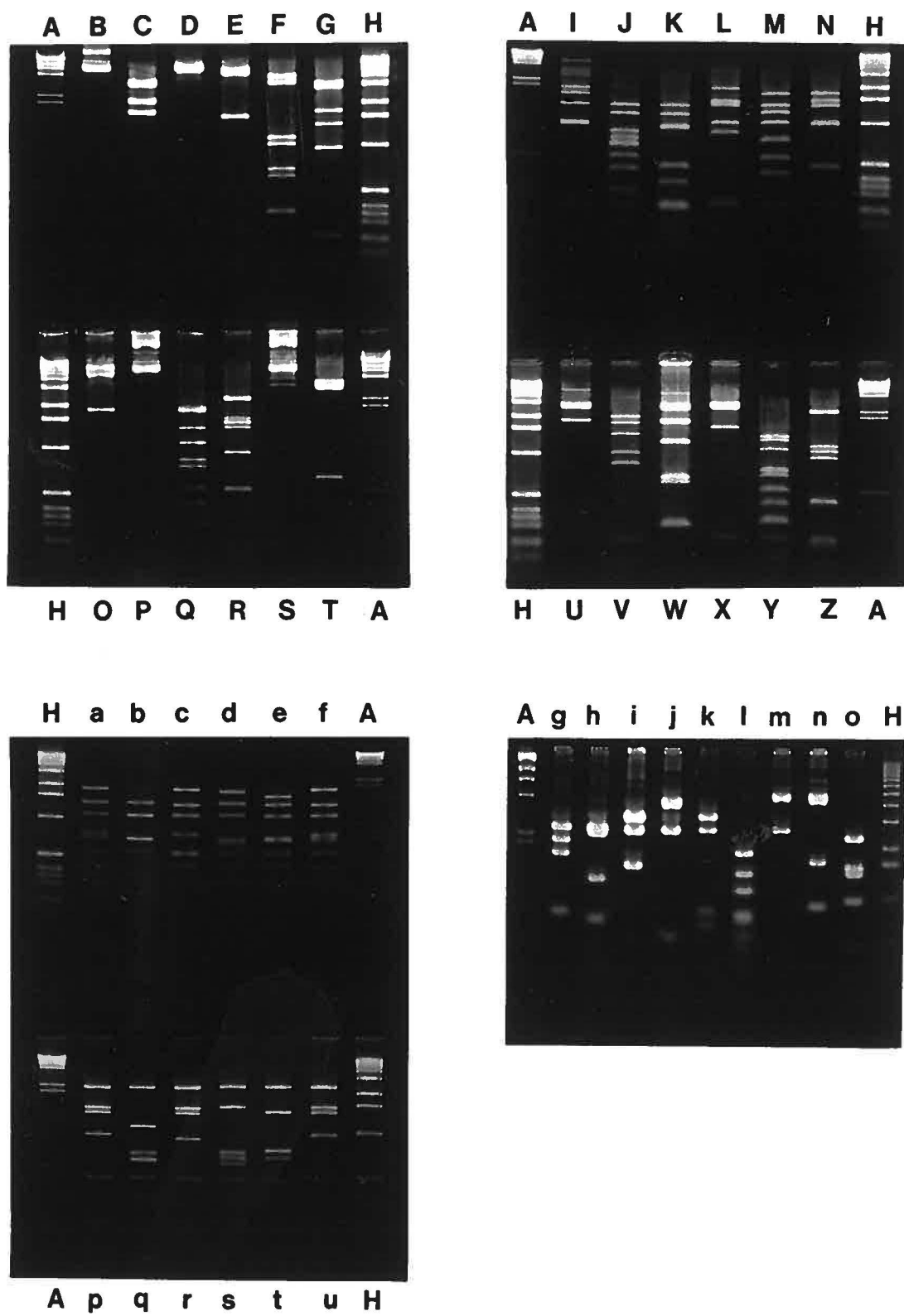




Figure 11

La Figure 11 montre la séparation électrophorétique des fragments de restriction de pRMT48. Il n'y a pas de sites SacI présents dans l'insertion de pRMT48 (puit B), ce site a donc été utilisé pour déterminer la polarité des fragments de restriction. Les sites suivants sont absents de l'insertion: SalI (puit D et m), SphI (puit P), StuI (puit S), et PvuI (puit n) (PvuI coupe deux fois dans pUC13). Les sites SmaI ont été localisés par rapport à EcoRI (puit k) et SacI (puit T). Le site KpnI a été localisé par rapport à EcoRI (puit U) et SacI (puit O). Les sites XhoI ont été localisés par rapport aux autres sites connus (puits E, X, L, Z), ainsi que les sites AvaII (puits G, I, L, M, N), et PvuII (puits p, r, s, t, u). Il a été impossible de placer avec certitude les sites ApaI et BglI.

Les cartes de restriction pRMT44 et pRMT48, déduites à partir des Figures 10 et 11, sont présentées à la Figure 12. Les régions homologues aux métallothionéines de souris et celles contenant de l'ADN répétitif, ont été obtenues à partir des Figures 6, 7 et 8, donc par rapport aux sites SmaI, XhoI, HindIII, BglII et BamHI, seulement. Il est possible que les régions d'hybridation soient moins étendues que ce qui est indiqué à la Figure 12.

Des sous-clones de délétions ont été générés à partir de pRMT44 et pRMT48 pour éliminer l'ADN répétitif et avoir des sondes plus spécifiques ainsi que pour résoudre certaines ambiguïtés dans les cartes de restriction. La procédure consiste à digérer les clones par un enzyme qui coupe dans l'insertion et le site de clonage multiple de pUC13, puis de faire une ligation à haute dilution pour favoriser la ligation intramoléculaire. Le sous-clone pRMT15 a été produit à partir de pRMT48

FIGURE 12. CARTE DE RESTRICTION DES INSERTIONS DE pRMT44 et pRMT48.

La position des sites est en Kb par rapport à l'extrémité de l'insertion et la précision est de  $\pm 50$  pb  représente les régions qui hybrident avec les sondes MTs;  représente les régions d'ADN répétitif. Les sites suivants sont absents de pRMT44: BamHI, KpnI, PvuI. Les sites suivants sont absents de pRMT48: SacI, SphI, SalI, PvuI.



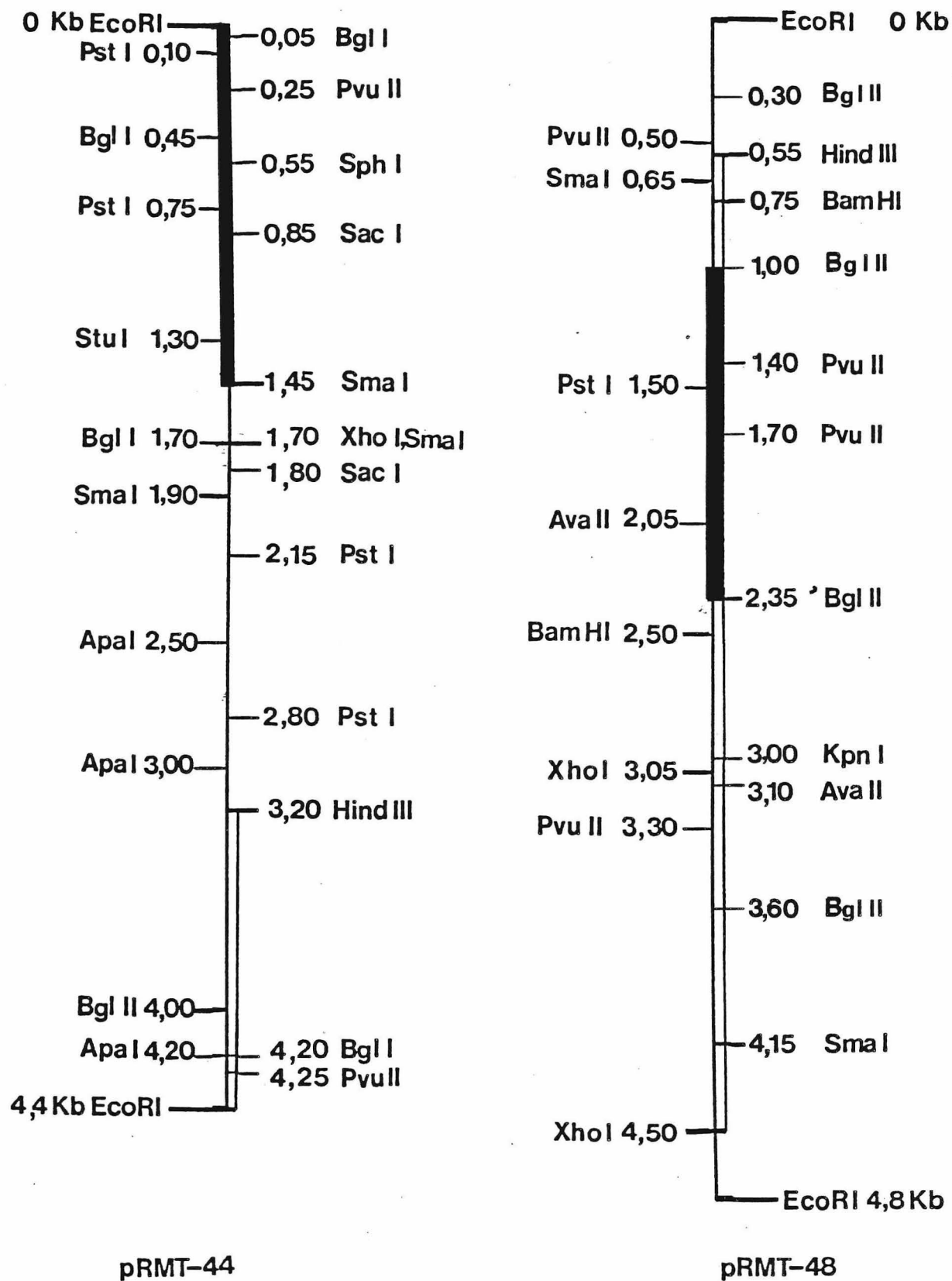


Figure 12

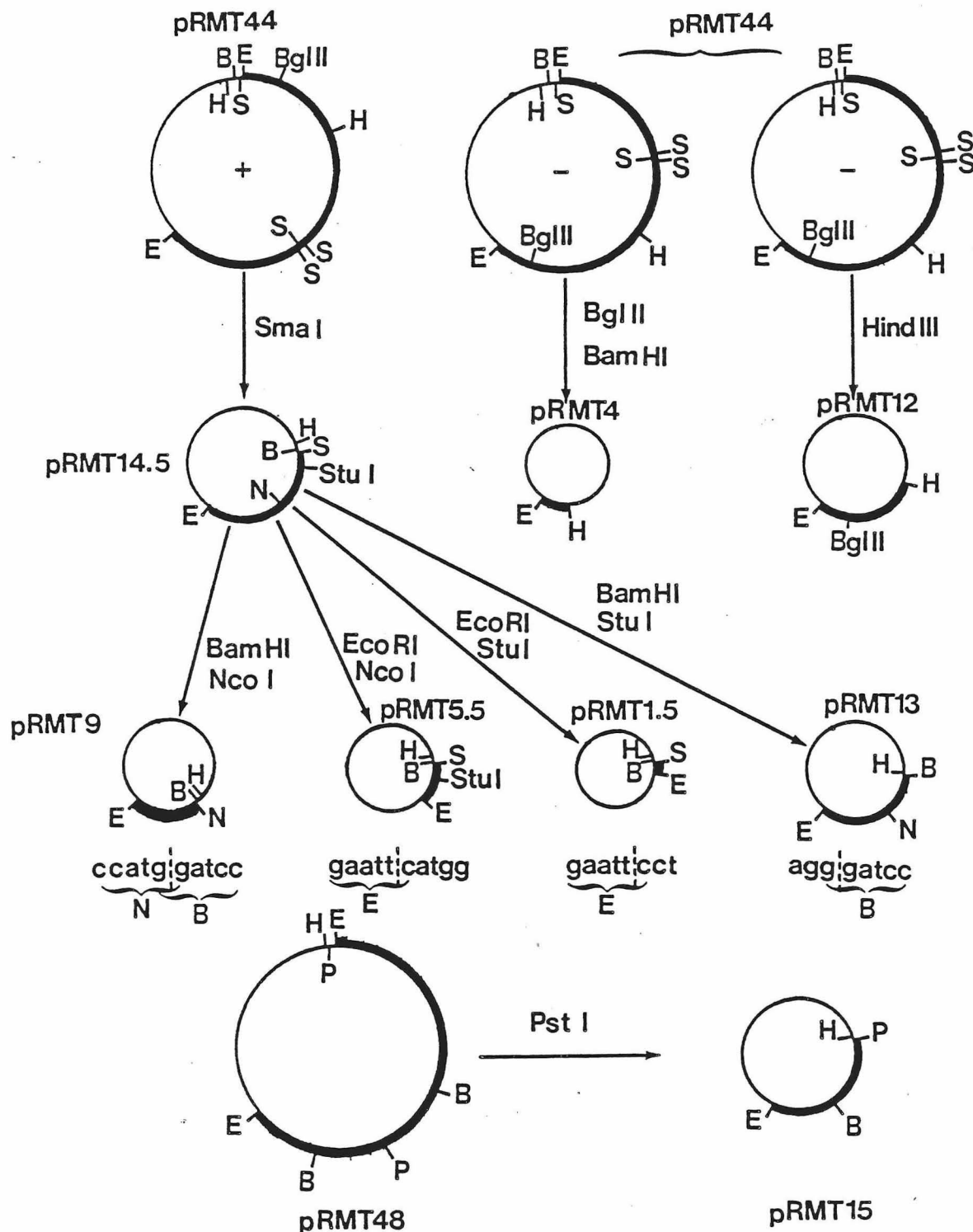


FIGURE 13. STRATEGIE DE GENERATION DES SOUS-CLONES DE DELETION.

B: BamHI, E: EcoRI, H: HindIII, N: NcoI, P: PstI, S: SmaI. Les enzymes utilisés sont indiqués à côté des flèches. Pour les sous-clones dérivés de pRMT14.5, les bouts ont été remplis à la Klenow, suivi d'une ligation à bouts francs; les séquences prédites au point de ligation (|) et les sites reconstitués (⌋) sont indiqués. + et - désigne la polarité de l'insertion de pRMT44.

par digestion avec PstI (Fig. 13) afin de placer avec certitude les sites BglII sur la carte de pRMT48. Le site PstI est situé à l'intérieur du fragment BamHI homologue à la MT-II de souris; le sous-clone pRMT15 contient de l'ADN répétitif (Fig. 12). Les régions d'ADN répétitif de pRMT44 ont été isolées par digestion avec HindIII pour donner pRMT12 et par double digestion avec BglII et BamHI pour donner pRMT4 (Fig. 13). Le sous-clone pRMT4 est inclus dans pRMT12. Pour isoler la région de pRMT44 homologue à la MT-I de souris, le sous-clone pRMT14.5 a été produit par digestion SmaI (Fig. 13); ce sous-clone possède un fragment EcoRI-SmaI de 1.45 Kb qui hybride avec la MT-I et est dépourvu d'ADN répétitif (Fig. 12). La procédure de délétion est efficace car tous les clones analysés avaient la taille attendue et les sites de clonage avaient été reconstitués (résultats non-présentés). D'autres sous-clones ont été produits à partir de pRMT14.5 (Fig. 13); les extrémités 5' saillantes ont été remplies avec le fragment de Klenow et une ligation à bouts francs a été effectuée. La paire de sites choisis était telle qu'au moins un des sites de restriction soit reconstitué (Fig. 13). Les sites prédits étaient présents dans tous les sous-clones analysés (résultats non-présentés). De l'ADN des sous-clones a été préparé et un rendement de 1 à 2 mg d'ADN a été obtenu.

La Figure 14 montre la séparation électrophorétique des fragments de restriction des sous-clones de délétion. La position exacte des sites PstI, BglII, BamHI, SmaI et HindIII de pRMT15 a été localisée (puits C, D, E, F, H, f, g) (une digestion EcoRI ne fait que linéariser les sous-clones de délétion). La position exacte des sites StuI (puits L, M, R, d), PstI (puit T), SalI (puit V), PvuII (puit W), SphI (puit b) et SacI (puit c) de pRMT14.5 a été localisée. Des sites NcoI (puits J et N)

FIGURE 14. SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES FRAGMENTS DE RESTRICTION DES SOUS-CLONES DE DELETION.

A: 1 Kb Ladders (BRL), B: pRMT15/EcoRI, C: pRMT15/EcoRI + PstI, D: pRMT15/EcoRI + BglIII, E: pRMT15/BamHI, F: pRMT15/SmaI, G: pRMT15/ApaI, H: pRMT15/HindIII, I: pRMT14.5/EcoRI + BamHI, J: pRMT14.5/BamHI + NcoI, K: pRMT14.5/BamHI + NaeI, L: pRMT14.5/BamHI + StuI, M: pRMT14.5/EcoRI + StuI, N: pRMT14.5/EcoRI + NaeI, O: pRMT14.5/EcoRI + NcoI, P: pRMT14.5/EcoRI, Q: pRMT14.5/EcoRI + SmaI, R: pRMT14.5/EcoRI + StuI, S: pRMT14.5/EcoRI + NaeI, T: pRMT14.5/EcoRI + PstI, U: pRMT14.5/BglI, V: pRMT14.5/SalI, W: pRMT14.5/PvuII, a:  $\lambda$ /HindIII (BRL), b: pRMT14.5/EcoRI + SphI, c: pRMT14.5/EcoRI + SacI, d: pRMT14.5/SmaI + StuI, e: 123 pb Ladders (BRL), f: pRMT15/EcoRI + BamHI, g: pRMT15/EcoRI + BglIII, h: pUC19/AvaII, i: pRMT14.5/AvaII, j: pRMT13/AvaII, k: pRMT9/AvaII, l: pRMT5.5/AvaII, m: pRMT1.5/AvaII.

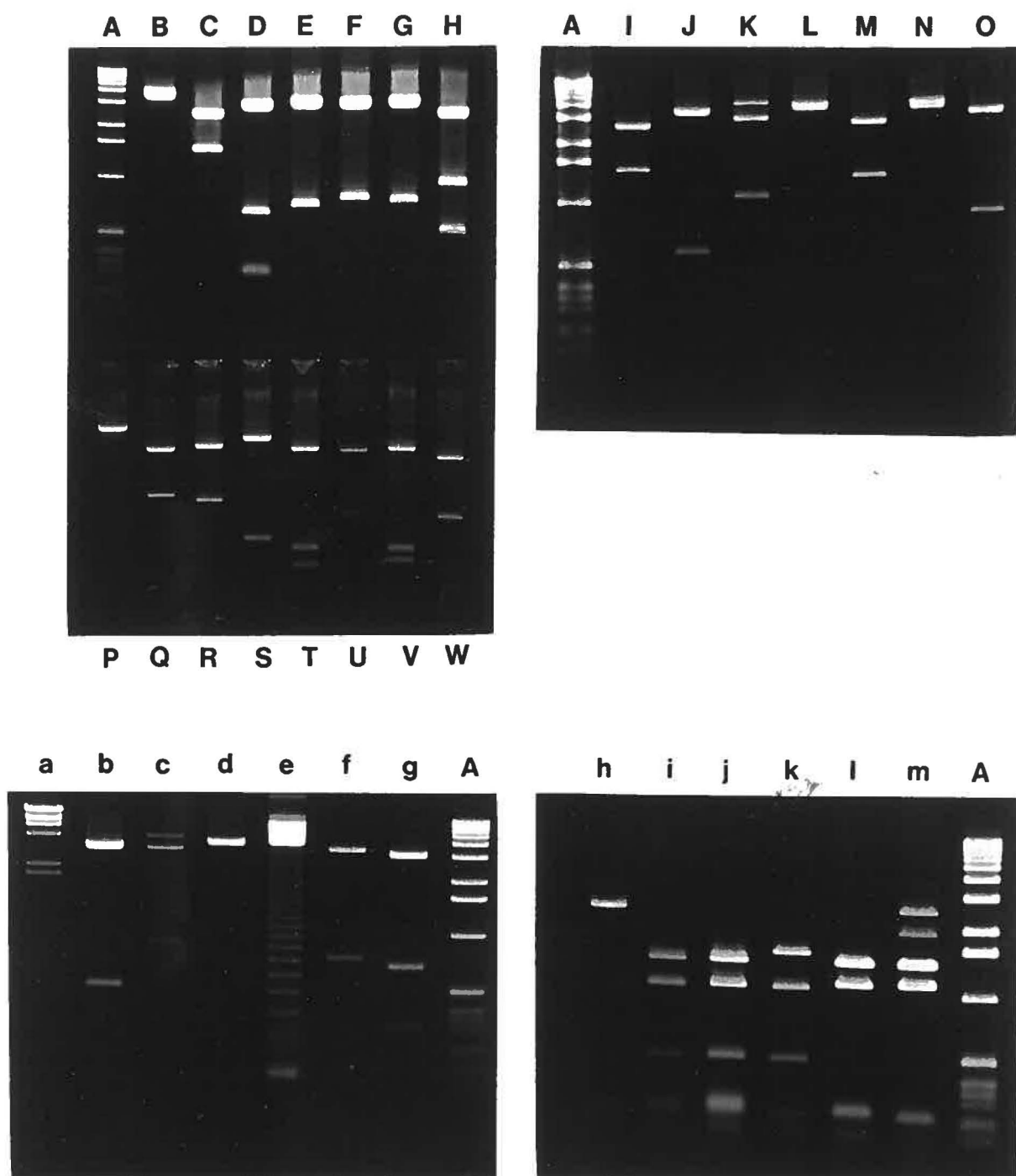


Figure 14

et NaeI (puits K et S) ont été trouvés et placés. Les digestions par AvaII des sous-clones pRMT14.5, pRMT13, pRMT9, pRMT5.5 et pRMT1.5 (puits i à m) ont permis d'orienter ces sites. Un site Sau3A situé dans l'insertion a été trouvé par digestion et électrophorèse sur gel de polyacrylamide (résultats non-présentés).

La Figure 15 montre la carte de restriction détaillée de pRMT14.5. Les nouveaux sites localisés font que la distance entre deux sites consécutifs connus n'excède pas 150 paires de bases.

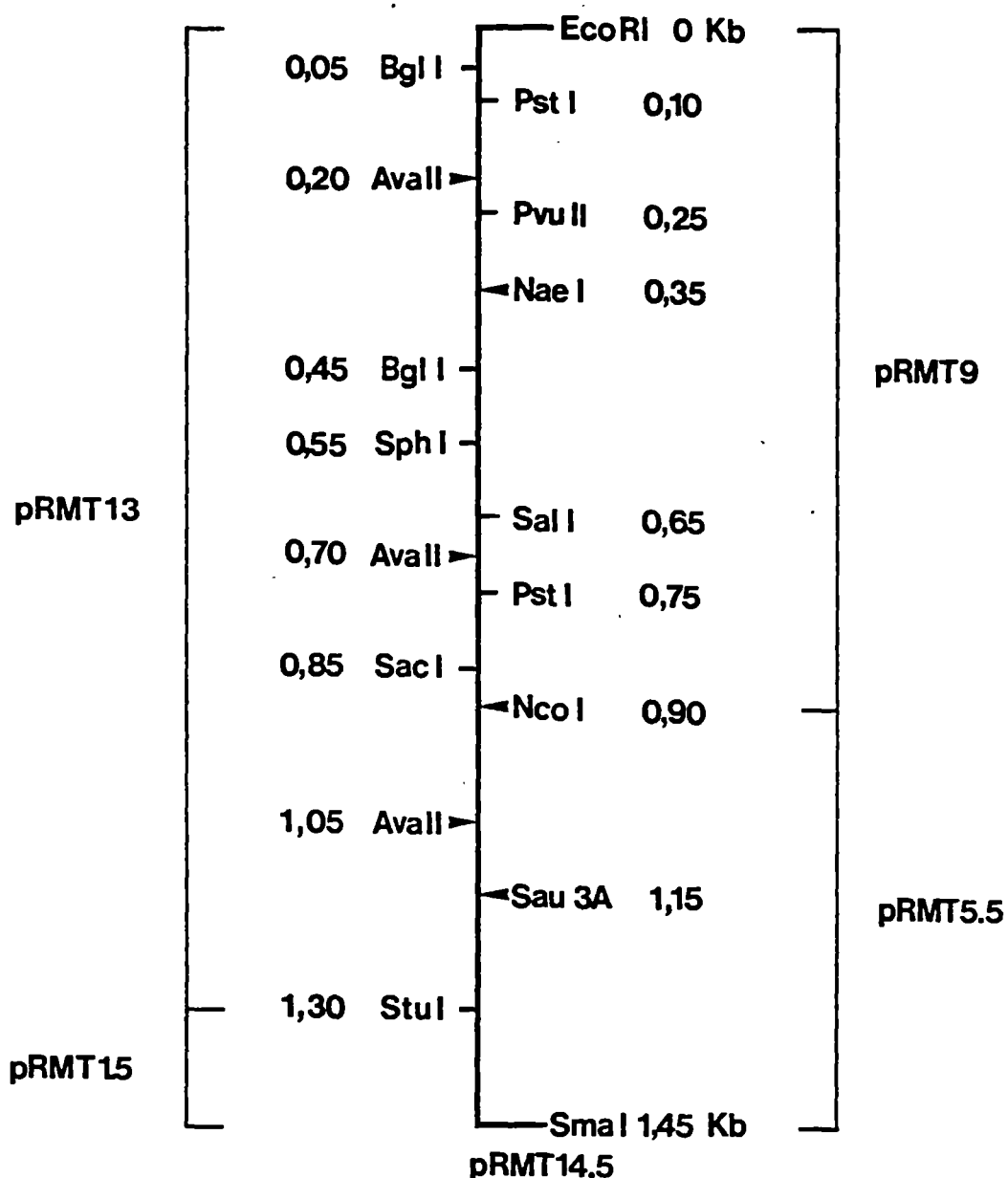


FIGURE 15. CARTE DE RESTRICTION DE pRMT14.5

Les sites indiqués par — ont été obtenus à partir des Figures 10 et 14. Les sites indiqués par ► ont été obtenus à partir de la Figure 14. Les insertions présentes dans les sous-clones de délétion pRMT1.5, pRMT13, pRMT9 et pRMT5.5 sont indiquées de part et d'autre de la carte de pRMT14.5.

## DISCUSSION

La première étape du projet consistait à tester l'hybridation croisée souris-lapin. Le plasmide pMMT2.2 a été construit pour éliminer la région 5' et une portion de la région 3' qui sont peu conservées entre les MTs, ainsi que les queues de poly G:C générées lors du clonage de l'ADNc (Mbikay et al., 1981); tous ces éléments présents dans la sonde initiale pourraient augmenter le bruit de fond ou révéler des bandes non-spécifiques. De plus, le site SmaI de pUC13 est flanqué de sites de restriction qui permettent d'exciser l'insertion marquée avec la polymérase du phage T4.

Un buvardage génomique a été effectué avec des conditions d'hybridation adaptées de Peterson et al. (1984), qui avaient utilisé l'ADNc de MT-I de souris pour isoler l'ADNc de MT-I de mouton (hybridation à 20°C, lavage à 30-40°C). Nous avons choisi d'augmenter la stringence de l'hybridation (37°C) et de diminuer la stringence du lavage (30°C) car le bactériophage  $\lambda$  donnait une hybridation considérable avec pUC13 dans les conditions de Peterson et al. (1984) ce qui limitait l'applicabilité au criblage d'une banque génomique dans un phage. La sonde MT-I de souris révèle dix bandes dans l'ADN de lapin coupé par EcoRI ce qui confirme que les MTs de lapin sont représentées par une famille étendue de gènes (Otvos et Armitage, 1980; Boulanger et al., 1983; Huziker, 1985\*). Les bandes révélées chez le lapin par les sondes MT-I et MT-II de souris sont qualitativement les mêmes, ce qui indique que la spécificité des sondes provient de la région codante du

\* Communication personnelle écrite.



dernier exon, puisque les séquences en 3' sont peu conservées entre les espèces (Fig. 1). Le contrôle d'ADN de souris coupé par EcoRI n'a pas donné les bandes attendues sans doute à cause d'une dégradation puisque la bande EcoRI d'ADN répétitif normalement visible à 1.6 Kb est absente (bande qui est visible à la Figure 6I).

Une banque génomique a été construite dans le bactériophage  $\lambda$ gt-10 puisque la sonde MT-I de souris révèle plusieurs bandes EcoRI de taille pouvant être acceptée par ce vecteur (<7.5 Kb).  $\lambda$ gt-10 a été choisi à cause de la taille considérable des plages obtenues, ce qui permet d'avoir un signal fort lors du criblage, et de son système de sélection des recombinants. Ce vecteur possède un site de restriction EcoRI unique, situé dans le gène du represseur cI; une insertion dans le site EcoRI interrompt le gène, ce qui empêche la lysogénie. La sélection des recombinants s'effectue sur la souche E. coli C600 Hfl (High frequency of lysogeny) sur laquelle les phages ayant un cI fonctionnel s'intègrent dans le chromosome de l'hôte et ne peuvent lyser la bactérie (Huynh et al., 1984).

De l'ADN de lapin coupé par EcoRI a été ligaturé à de l'ADN de  $\lambda$ gt-10 coupé par EcoRI, en présence de PEG 8000 15%. Le PEG favorise la ligation inter-moléculaire avec formation de concatémères, le substrat préféré pour l'encapsidation (Pheiffer et Zimmerman, 1983). Le rapport molaire vecteur: ADN de lapin a été optimisé et le meilleur rendement a été obtenu avec un rapport 2:1 ( $5.7 \times 10^5$  pfu/ug). Un total de  $1 \times 10^6$  recombinants ont été générés. Puisque la taille d'un génome haploïde de mammifère est de  $3 \times 10^9$  pb (Maniatis et al., 1982) et que,

statistiquement, EcoRI coupe à toutes les 4096 pb, on s'attend à ce que  $7,3 \times 10^5$  fragments EcoRI soient générés. Les  $1 \times 10^6$  recombinants obtenus sont donc représentatifs des fragments EcoRI pouvant être clonés ( $< 7,5$  Kb) dans  $\lambda$ gt-10. Une moitié de la banque ( $4,8 \times 10^5$  pfu) a été criblée sans amplification pour éviter de perdre des recombinants qui auraient un désavantage de croissance et seraient sous-représentés dans une banque amplifiée et huit candidats ont été obtenus avec une sonde préparée avec la polymérase du phage T4 sur l'insertion de pMMT2.2.

De l'ADN des candidats a été préparé, coupé par EcoRI pour exciser les insertions, buvardé et hybridé avec une sonde sur l'insertion de pMMT2.2 et une sonde sur pUC13, afin de s'assurer que les signaux obtenus au premier criblage ne provenaient pas du vecteur marqué. La sonde MT-I révèle une bande EcoRI de 4,1 Kb dans l'ADN de souris, qui correspond au fragment portant le gène MT-I (l'ADN de souris était en bon état puisque la bande EcoRI d'ADN répétitif est visible à 1.6 Kb). Des bandes de 1.7 Kb, 4.4 Kb, 4.8 Kb et 4.5 Kb sont révélées chez les candidats 7-1, 9-1, 10-1 et 11-1 par la sonde MT-I mais pas par la sonde pUC13; les bandes de 4.4 Kb, 4.5 Kb et 4.8 Kb peuvent être vues dans l'ADN de lapin coupé par EcoRI alors que la bande de 1.7 Kb y est absente. Ces candidats ont été choisis pour purification complète avec une sonde par déplacement d'encoche, puisque pUC13 n'hybride pas avec les candidats. Les candidats 7-1, 9-1, 10-1 et 11-1 ont été purifiés et la pureté des clones a été démontrée en les étalant à basse densité puis en vérifiant que toutes les plages de lyse obtenues hybridaient avec une sonde MT-I de souris.

Une carte de restriction sommaire des clones a été dressée pour les enzymes EcoRI, XhoI, HindIII, BglII, SmaI et BamHI, dont la position est connue sur  $\lambda$ gt-10. Les fragments de restriction obtenus ont été buvardés et hybridés avec des sondes par déplacement d'encoche sur pMMT2.2, pMMT1.6 et l'ADN total de lapin. La sonde sur l'ADN total de lapin permet de détecter les séquences d'ADN hautement répétitif que l'on savait présentes sur le clone 10-1; lorsque le clone 10-1 purifié avait été utilisé comme sonde pour un buvardage génomique, une trainée a été révélée dans l'ADN de lapin mais pas chez l'ADN de souris, indiquant que le clone 10-1 possédait de l'ADN hautement répétitif particulier au lapin; l'ADN de lapin coupé par BamHI n'a pas produit cette trainée, il est possible que l'ADN répétitif soit porté sur un petit fragment BamHI qui serait sorti du gel. Les fragments de restriction ont aussi été hybridés avec une sonde sur pUC13 et aucuns signaux n'ont pu être détectés.

Les sondes MT-I et MT-II révèlent les mêmes bandes; le clone 10-1 hybride beaucoup plus intensément avec la MT-II qu'avec la MT-I, alors que le clone 9-1 est celui qui hybride le plus fort avec la MT-I. Les 4 clones possèdent de l'ADN hautement répétitif situé sur l'extrémité distale de la région hybridant avec la MT-I pour  $\lambda$ RMT44 et de part et d'autre de la région hybridant avec la MT-II pour  $\lambda$ RMT48.

Les clones  $\lambda$ RMT44 et  $\lambda$ RMT48 ont été choisis pour une caractérisation plus détaillée car  $\lambda$ RMT48 est homologue à la MT-II et  $\lambda$ RMT44 est homologue à la MT-I et ne possède pas d'ADN répétitif situé à proximité de la région d'homologie. Le clone  $\lambda$ RMT51 n'a pas été

caractérisé car il semble similaire au clone  $\lambda$ RMT44 et que une bande EcoRI de 5.1 Kb n'a pu être vue dans les buvardages génomiques d'ADN de lapin; de plus, ce clone avait une insertion de 1.7 Kb lors du buvardage sur les candidats du premier criblage. Il est possible que ce fragment de 1.7 Kb soit dû à une activité EcoRI étoile, mais il n'est pas possible d'écarter la possibilité d'un réarrangement qui se serait produit in vivo. Le clone  $\lambda$ RMT45 mériterait une caractérisation plus poussée, car il possède un patron de restriction assez différent du clone  $\lambda$ RMT44. Le vecteur plasmidique pUC13 a été utilisé pour le sous-clonage des insertions. La souche E. coli JM109 (Yanisch-Perron et al., 1985) possède la mutation recA et a été utilisée afin de minimiser la recombinaison possible, pouvant mener à des délétions, insertions ou réarrangements des clones. Les clones purifiés ( $\lambda$ RMT44 et  $\lambda$ RMT48) ont été coupés par EcoRI puis ligaturés à pUC13 sans purification des insertions. Les mélanges de transformation ont été étalés et criblés par hybridation sur colonies en utilisant des sondes par déplacement d'encoche sur les clones purifiés  $\lambda$ RMT44 et  $\lambda$ RMT48. L'insertion de  $\lambda$ RMT44 a été clonée dans les deux orientations possibles (pRMT44<sup>+</sup> et pRMT44<sup>-</sup>) et celle de  $\lambda$ RMT48 l'a été dans une seule (pRMT48<sup>+</sup>). Une carte de restriction détaillée des sous-clones pRMT44 et pRMT48 a été dressée pour plusieurs enzymes. Des sous-clones de délétion ont été produits afin de séparer la région d'homologie à la MT-I de pRMT44 de la région contenant de l'ADN répétitif ce qui permet d'avoir une sonde plus spécifique. Les sous-clones ont aussi été produits pour pouvoir localiser avec précision les sites AvaII et BamHI. Un de ces sites est toujours présent au début de la région codante de toutes les MTs séquencées à ce jour; la localisation de ces sites va donc permettre

d'élaborer une stratégie rationnelle de sous-clonage pour pouvoir faire la séquence de la région codante. Le clone  $\lambda$ RMT44 ne possède pas de sites BamHI, donc un des deux sites AvaII situés dans pRMT14.5 pourrait correspondre au début de la région codante. Le clone pRMT48 possède un site AvaII interne à la région d'homologie avec la MT-II de souris et deux sites BamHI situés tout juste à l'extérieur de la région d'hybridation; ces sites BamHI peuvent potentiellement correspondre au début de la région codante car, rappelons le, la sonde MT-II de souris utilisée ne couvre pas le premier exon. Une carte de restriction détaillée de pRMT14.5 a été dressée pour les enzymes NaeI, SalI, NcoI, Sau3A et AvaII. Les nouveaux sites localisés, en combinaison avec les sites localisés sur pRMT44, font que la distance entre deux sites consécutifs connus n'excède pas 150 pb. Si on assume que l'on peut lire plus de 150 pb sur un gel de séquence, suffisamment de sites ont été localisés sur pRMT14.5 pour le séquencer en entier par dégradation chimique ou par terminaison de chaîne.

## CONCLUSION

Des conditions d'hybridation ont été adaptées pour détecter des gènes MTs de lapin avec une sonde MT-I de souris. Les sondes MT-I et MT-II de souris ont révélées l'existence d'une famille de gènes MTs chez le lapin. Une banque génomique de lapin a été construite dans le bactériophage  $\lambda$ gt-10 et 4 clones ont été purifiés de cette banque. Le clone  $\lambda$ RMT44 est homologue à la MT-I de souris alors que le clone  $\lambda$ RMT48 est homologue à la MT-II de souris. Tous les clones purifiés contiennent de l'ADN hautement répétitif. Les clones  $\lambda$ RMT44 et  $\lambda$ RMT48 ont été sous-clonés dans le vecteur pUC13 et des cartes de restriction détaillées ont été dressées. Une procédure de génération de sous-clones de délétion a été développée et la région d'hybridation à la MT-I de souris de pRMT44, ainsi que l'ADN répétitif de pRMT44 et pRMT48 ont été sous-clonés de cette manière. De nouveaux sites de restriction ont été localisés sur la région d'hybridation à la MT-I de pRMT44 (pRMT14.5). La distance entre deux sites consécutifs connus n'excède pas 150 pb ce qui devrait rendre plus aisé un éventuel séquençage de cette région.

BIBLIOGRAPHIE

- Andersen, R.D., Piletz, J.E., Birren, B.W., Herschman, H.R. (1983) Levels of metallothionein messenger RNA in foetal, neonatal and maternal rat liver. Eur. J. Biochem. 131: 497-500.
- Andersen, R.D., Birren, B.W., Taplitz, S.J., Herschman, H.R. (1986) Rat metallothionein-I structural gene and three pseudogenes, one of which contains 5'-regulatory sequences. Mol. Cell. Biol. 6(1): 302-314.
- Beach, L.R., Palmiter, R.D. (1981) Amplification of the metallothionein-I gene in cadmium-resistant mouse cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(4): 2110-2114.
- Beaman, L., Beaman, B.L. (1984) The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. Ann. Rev. Microbiol. 38: 27-48.
- Boulanger, Y., Goodman, C.M., Forte, C.P., Fesik, S.W., Armitage, I.M. (1983) Model for metallothionein structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1501-1505.
- Brady, F.O. (1982) The physiological function of metallothionein. TIBS 7: 143-145.

- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Warren, R., Sarthy, A., Palmiter, R.D.  
(1982) Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion  
plasmids injected into mouse eggs. *Nature* 296: 39-42.
- Cagen, S.Z., Klaassen, C.D. (1980) Binding of glutathione-depleting  
agents to metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 54: 229-237.
- Compere, S.J., Palmiter, R.D. (1981) DNA methylation controls the  
inducibility of the mouse metallothionein-I gene in lymphoid cells.  
*Cell* 25: 233-240.
- Cousins, R.J. (1985) Absorbtion, transport, and hepatic metabolism of  
copper and zinc: special reference to metallothionein and  
ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65(2): 238-308.
- Cox, D.R., Palmiter, R.D. (1983) The metallothionein-I gene maps to  
mouse chromosome 8: implication for human Menke's disease. *Hum.*  
*Genet.* 64: 61-64.
- Crawford, B.D., Enger, M.D., Griffith, B.B., Griffith, J.K., Hanners,  
J.L., Longmire, J.L., Munk, A.C., Stallings, R.L., Tesmer, J.G.,  
Walters, R.A., Hildebrand, C.E. (1985) Coordinate amplification of  
metallothionein I and II genes in cadmium-resistant chinese hamster  
cells: implications for mechanisms regulating metallothionein gene  
expression. *Mol. Cell. Biol.* 5(2): 320-329.



- DiSilvestro, R.A., Cousins, R.J. (1984) Glucocorticoid independent mediation of Interleukin-I induced changes in serum zinc and liver metallothionein levels. *Life Sci.* 35: 2113-2118.
- Doerfler, W. (1983) DNA methylation and gene activity. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 93-124.
- Durnam, D.M., Palmiter, R.D. (1981) Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *J. Biol. Chem.* 256(11): 5712-5716.
- Durnam, D.M., Hoffman, J.S., Quaife, C.J., Benditt, E.P., Chen, H.Y., Brinster, R.L., Palmiter, R.D. (1984) Induction of mouse MT-I mRNA by bacterial endotoxin is independent of metals and glucocorticoid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1053-1056.
- Durnam, D.M., Palmiter, R.D. (1984) Induction of metallothionein mRNA in cultured cells by heavy metals and iodoacetate: evidence for gratuitous inducers. *Mol. Cell. Biol.* 4(3): 484-491.
- Durum, S.K., Schmidt, J.A., Oppenheim, J.J. (1985) Interleukin I: An immunological perspective. *Ann. Rev. Immunol.* 3: 263-287.
- Friedman, R.L., Manly, S.P., McMahon, M., Kerr, I.A., Stark, G.R. (1984) Transcriptional and posttranscriptional regulation of IFN-induced gene expression in human cells. *Cell* 38: 745-755.

- Freidman, R.L., Stark, G.R. (1985)  $\alpha$ -interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature* 314: 637-639.
- Gick, G.G., McCarty, K.S. (1982) Amplification of the metallothionein-I gene in cadmium - and zinc - resistant chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 257(15): 9049-9053.
- Griffith, B.B., Walters, R.A., Hildebrand, C.E., Griffith, J.K. (1983) cDNA cloning and nucleotide sequence comparison of chinese hamster metallothionein I and II mRNAs. *Nuc. Acids Res.* 11(3): 901-910.
- Grunstein, M., Wallis, J. (1979) Colony hybridization. *Meth. Enzymol.* 68: 379-395.
- Hager, L.J., Palmiter, R.D. (1981) Transcriptional regulation of mouse liver metallothionein-I gene by glucocorticoids. *Nature* 291: 340-342.
- Huynh, T.V., Young, R.A., Davis, R.W. Construction and screening cDNA libraries in  $\lambda$ gt-10 and  $\lambda$ gt-11. Dans David Glover ed.: DNA cloning techniques: a practical approach, IRL Press, Oxford. (1984).
- Kagi, J.H.R., Nordberg, M. eds Metallothionein. Birkhauser Verlag, Basel. (1979).

- Kagi, J.H.R., Vasak, M., Lerch, R. Gilg, D.E.O., Huziker, P., Bernhard, N.R., Good, M. (1984) Structure of mammalian metallothionein environ. Health Perspect. 54: 93-103.
- Karin, M., Andersen, R.D., Slater, E., Smith, K., Herschman, H.R. (1980) Metallothionein mRNA induction in HeLa cells in response to zinc or dexamethasone is a primary induction response. Nature 286: 295-297.
- Karin, M., Herschman, H.R. (1979) Dexamethasone stimulation of metallothionein synthesis in HeLa cell cultures. Science 204: 176-177.
- Karin, M., Herschman, H.R. (1981) Induction of metallothionein in HeLa cells by dexamethasone and zinc. Eur. J. Biochem. 113: 267-272.
- Karin, M., Richards, R.I. (1982) Human metallothionein genes-primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. Nature 299: 797-802.
- Karin, M., Cathala, G., Nguyen-Huu, M.C. (1983) Expression and regulation of a human metallothionein gene carried on an autonomously replicating shuttle vector. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80: 4040-4044.
- Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Cathala, G., Slater, E., Baxter, J.D. (1984a) Activation of a heterologous promoter in response to dexamethasone and cadmium by metallothionein gene 5'-flanking DNA. Cell 36: 371-379.

- Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R.I., Krauter, P., Westphal, H.M., Beato, M. (1984b) Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-II<sub>A</sub> gene. *Nature* 308: 513-519.
- Karin, M., Eddy, R.L., Henry, W.M., Haley, L.L., Byers, M.G., Shaws, T.B. (1984c). Human metallothionein genes are clustered on chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5494-5498.
- Karin, M. (1985) Metallothioneins: proteins in search of function. *Cell* 41: 9-10.
- Klauser, S., Kagi, J.H.R., Wilson, K.J. (1983) Characterization of isoprotein patterns in tissue extracts and isolated samples of metallothioneins by reverse - phase high - pressure liquid chromatography. *Biochem. J.* 209: 71-80.
- Koizumi, S., Otaki, N., Kimura, M. (1985) Evidence for more than two metallothionein isoforms in primates. *J. Biol. Chem.* 260(6): 3672-3675.
- Lengyel, P. (1982) Biochemistry of interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 251-282.
- Li, T.Y., Kraker, A.J., Shaw, C.F., Petering, D.H. (1980) Ligand substitution reactions of metallothioneins with EDTA and apo-carbonic anhydrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(11): 6334-6338.

- Lieberman, M.W., Beach, L.R., Palmiter, R.D. (1983) Ultraviolet radiation - induced metallothionein - I gene activation is associated with extensive DNA demethylation. *Cell* 35: 207-214.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. Dans: Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y. (1982)
- Mayo, K.E., Palmiter, R.D. (1981) Glucocorticoid regulation of metallothionein-I mRNA synthesis in cultured mouse cells. *J. Biol. Chem.* 256(6): 2621-2624.
- Mayo, K.E., Palmiter, R.D. (1982) Glucocorticoid regulation of the mouse metallothionein I gene is selectively lost following amplification of the gene. *J. Biol. Chem.* 257: 3061-3067.
- Mayo, K.E., Warren, R., Palmiter, R.D. (1982) The mouse metallothionein-I gene is transcriptionally regulated by cadmium following transfection into human or mouse cells. *Cell* 29: 99-108.
- MBikay, M., Maiti, I.B., Thirion, J.-P. (1981) Cloning and sequencing of cDNA for mouse metallothionein-I. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 103(3): 825-832.
- McKnight, G.S. (1978) The induction of ovalbumin and conalbumin mRNA by estrogen and progesterone in chick oviduct explant cultures. *Cell* 14: 403-413.

- Meinkoth, J., Wahl, G. (1984) Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138: 267-284.
- Neilson, K.B., Winge, D.R. (1983) Order of metal binding in metallothionein. *J. Biol. Chem.* 258(21): 13063-13069.
- O'Farrell, P. (1981) Replacement synthesis method of labeling DNA fragments. *Focus* 3: 1-3.
- Otvos, J.D., Armitage, I.M. (1980) Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7094-7098.
- Peterson, M.G., Lazdins, I., Danks, D.M., Mercer, J.F.B. (1984) Cloning and sequencing of a sheep metallothionein cDNA. *Eur. J. Biochem.* 143: 507-511.
- Pheiffer, B.H., Zimmerman, S.B. (1983) Polymer stimulated ligation: enhanced blunt - or cohesive - end ligation of DNA or deoxyribonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions. *Nuc. Acids Res.* 11(22): 7853-7871.
- Richards, R.I., Heguy, A., Karin, M., (1984) Structural and functional analysis of the human metallothionein-I<sub>A</sub> gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. *Cell* 37: 263-272.

- Scherer, G., Telford, J., Baldari, C., Pirrotta, V. (1981) Isolation of cloned genes differentially expressed at early and late stages of Drosophila embryonic development. Develop. Biol. 86: 438-447.
- Schmidt, C.J., Hamer, D.H. (1983) Cloning and sequence analysis of two monkey metallothionein cDNAs. Gene, 24: 137-146.
- Searle, P.F., Davison, B.L., Stuart, G.W., Wilkie, T.M., Norstedt, G., Palmiter, R.D. (1984) Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein-I and metallothionein-II genes. Mol. Cell. Biol. 4(7): 1221-1230.
- Séguin, C., Felber, B.K., Carter, A.D., Hamer, D.H. (1984) Competition for cellular factors that activate metallothionein gene transcription. Nature 312: 781-785.
- Shapiro, S.G. Cousins, R.J. (1980) Induction of rat liver metallothionein mRNA and its distribution between free and membrane-bound polyribosomes. Biochem. J. 190: 755-764.
- Sobocinski, P.Z., Canterbury, W.J., Mapes, C.A., Dinterman, R.E. (1978) Involvement of hepatic metallothioneins in hypozincemia associated with bacterial infection. Am. J. Physiol. 234: E399-E406.
- Sobocinski, P.Z., Canterbury, W.J. Jr. (1982) Hepatic metallothionein induction in inflammation. Ann. N.Y. Acad. Sci. 389: 354-367.

- Stallings, R.L., Munk, A.C., Longmire, J.L., Hilderbrand, C.E., Crawford, B.D. (1984) Assignment of genes encoding metallothionein-I and metallothionein-II to chinese hamster chromosome 3: Evidence for the role of chromosome rearrangement in gene amplification. *Mol. Cell. Biol.* 4(12): 2932-2936.
- Stuart, G.W., Searle, P.F., Chen, H.Y., Brinster, R.L., Palmiter, R.D. (1984) A 12-base-pair DNA motif that is repeated several times in metallothionein gene promoters confers metal regulation to a heterologous gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81: 7318-7322.
- Stuart, G.W., Searle, P.F., Palmiter, R.D. (1985) Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature* 317: 828-831.
- Tobey, R.A., Enger, M.D., Griffith, J.K., Hildebrand, C.E. (1982) Zinc-induced resistance to alkylating agents: Lack of correlation between cell survival and metallothionein content. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 64: 72-78.
- Tobey, R.A., Seagrave, J. (1984) Inducibility of metallothionein throughout the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 4(10): 2243-2245.
- Udom, A.O., Brady, F.O. (1980) Reactivation in vitro of zinc - requiring apo - enzymes by rat liver zinc-thionein. *Biochem. J.* 187: 329-335.



- Varshney, U., Gedamu, L. (1984) Human metallothionein MT-I and MT-II processed genes. *Gene* 31: 135-145.
- Varshney, U., Jahroudi, N., Foster, R. Gedamu, L. (1986) Structure, organisation, and regulation of human metallothionein I<sub>F</sub> gene: differential and cell-type-specific expression in response to heavy metals and glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* 6(1): 26-37.
- Webb, M. (1972) Protection by zinc against cadmium toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 21: 2767-2771.
- Yagle, M.K., Palmiter, R.D. (1985) Coordinate regulation of mouse metallothionein-I and metallothionein-II genes by heavy metals and glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* 5(2): 291-294.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.